

OMZETTINGEN VAN KOOLHYDRATEN IN HET BLAD VAN NICOTIANA TABACUM L.

MIT REFERAT:

DER KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL IM
LAUBBLATT VON NICOTIANA TABACUM L.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR
IN DE LANDBOUW NUNDE AAN DE LANDBOUW-
HOOGESCHOOL TE WAGENINGEN, OP GEZAG VAN
DEN RECTOR-MAGNIFICUS J. VAN BAREN, HOOG-
LEERAAR IN DE DELFSTOF- EN AARDKUNDE, VOOR
EEN, — OVEREENKOMSTIG ART. 46, LID 4 VAN DE
WET VAN 15 DECEMBER 1917 TOT REGELING VAN
HET HOGER LANDBOUW- EN VEEARTSENIJKUN-
DIG ONDERWIJS (STAATSBLAG No. 700), — DAAR-
TOE BENOEMDE COMMISSIE UIT DEN SENAAT,
TE VERDEDIGEN OP VRIJDAG 6 MAART 1925 DES
NAMIDDAGS TEN 4 URE DOOR

DIRK TOLLENAAR

GEBOREN TE MEESTER CORNELIS (JAVA)



H. VEENMAN & ZONEN — WAGENINGEN — 1925

STELLINGEN.

I.

Het verdwijnen van zetmeel o.a. uit bladen van *Nicotiana tabacum* L. en *Solanum tuberosum* L. onder gunstige groeivoorwaarden in het donker, wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de verademing en niet door afvoer van dit zetmeel in den vorm van zijn afbrekingsproducten.

II.

Het eerste assimilatieproduct in den vorm van koolhydraten is niet saccharose, doch een monosaccharide.

III.

De „donkergroeireactie” is eigenlijk een verduisteringsreactie.

IV.

De z.g. Iepenziekte is een infectieziekte.

V.

Wanneer plantencorganen groeireacties uitvoeren, als gevolg van het gaan toevoeren eener constante energiestroom, dan treden er na aanpassing, bij het opheffen dezer bestraling, eveneens groeireacties op, welke tegengesteld zijn aan de eerste, meestal echter minder sterk zijn en eerder wegsterven.

VI.

Het snelle verdwijnen van zetmeel in rijpende vruchten, evenals in bladen en in het embryo van zaden bij uitdrogen, is een gevolg van het feit, dat de leukoplasten de functie verliezen, om zetmeel uit suikers op te bouwen.

VII.

De sterke krommingen, welke *Avena-coleoptielen* volgens KONINGSBERGER uitvoeren, wanneer ze op de horizontale as eener klinostaat in het donker roteeren, nadat ze 2 uren eenzijdig met 90 MK. werden belicht, zouden niet verklaard zijn, ook al ontbrak een donkergroeireactie.

VIII.

De geboortestatistieken van ons land wijzen zelfs in de laatste vier decennia een verandering aan, welke neerkomt op een meer gelijkmatige verdeeling van de geboorten over het geheele jaar; dit proces is in de groote steden reeds verder voortgeschreden dan op het platteland.

IX.

De legstatistieken onzer hoenders en de eierproductie der wilde vogelsoorten, vertoonen dezelfde regelmatigheden in periodiciteit en evolutie, als de geboortestatistieken van ons land.

X.

De ophooping van zetmeel, welke men waarneemt in bladen van bladrolzieke Aardappels en vele andere viruszieke planten, kan niet verklaard worden door storingen in den afvoer, doch is te wijten aan een verschuiving der enzymatische verhoudingen onder invloed van de ziekteoorzaak.

XI.

Om de noodige exactheid in de studie der biologische wetenschappen te bereiken, en in 't bijzonder, om de betrouwbaarheid en daardoor de waarde der resultaten van proefnemingen te kunnen beoordeelen, moeten bioloog en landbouwkundig ingenieur vertrouwd zijn met de beginselen der waarschijnlijkheidsrekening.

XII.

Zijn x_1, x_2, \dots, x_n uitkomsten eener grootheid met middelbare fouten $\sigma_1, \sigma_2, \dots, \sigma_n$, dan moet de middelbare fout $\sigma_{\bar{x}}$ van het

gemiddelde: $\bar{x} = \frac{\sum \frac{x_k}{\sigma_k^2}}{\sum \frac{1}{\sigma_k^2}}$ berekend worden uit de formule:

$$\sigma_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{1}{\sum \frac{1}{\sigma_k^2}}} \text{ en niet volgens de formule } \sigma_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum \left(\frac{x_k - \bar{x}}{\sigma_k} \right)^2}{(n-1) \sum \frac{1}{\sigma_k^2}}}$$

zooals BAULE dit aangeeft (Fühlings Landwirtsch. Zeitung, Bd. 62, 1913) en GEERTS het toepast op opbrengstverschillen van Suikerriet (Suikerarchief 1914, dl. 1).

XIII.

In een dicht bevolkt en vlak land als Nederland behoort de Overheid met veel grotere kracht dan tot nu toe het behoud van natuurmonumenten te bevorderen; er dient voor de dichtst bevolkte centra een plan te worden opgemaakt, waarbij de terreinen aangegeven worden, welke voor stadsuitbreiding, landbouwbedrijf en natuurmonument op zichzelf en in onderlinge harmonie het geschiktst zijn.

XIV.

Om redenen van productievergrooting zullen zelfs bij een verdere toename van bevolking de eenmaal als natuurmonument aangewezen terreinen niet van bestemming mogen veranderen, evenmin als dit voor een verdere stadsuitbreiding zal mogen geschieden.

XV.

De theorie van BLACKMAN, volgens welke de verschillende factoren (lichtintensiteit, temperatuur, CO₂-concentratie, enzym-verhoudingen, enz.) onder bepaalde omstandigheden voor de assimilatiesterkte „limiting” kunnen zijn, is in haar algemeenheid onjuist. Alleen de factor licht kan „limiting” in den zin van BLACKMAN wezen, de andere factoren kunnen echter hoewel begrensd in elkaars plaats treden en zoo de assimilatiesterkte doen toenemen.

XVI.

De diastatische functie van volgens BROWN en MORRIS gedroogd bladpoeder, wijkt af van deze eigenschap in het levende blad.

Aan mijne Ouders

Nu ik bij het afsluiten mijner studie aan de Landbouwhoogeschool een oogenblik terugzie, ben ik met dankbaarheid vervuld jegens Wageningen en degenen die hier aan mijn wetenschappelijke vorming meewerkten. Jegens Wageningen, omdat men er niet slechts leert kennen de bron van nieuw levensgeluk, die wetenschappelijke arbeid kan schenken, namelijk de mogelijkheid, om zelf te vinden en zelf te scheppen; maar ook, omdat er daarnaast de drang is, die ons ernaar doet streven de opgedane ervaringen in de practijk in toepassing te brengen, hetgeen een verbreeding en verdieping dezer kennis kan meebrengen. En vooral maakt dit laatste, dat we steeds voor oogen moeten houden, behalve menschen van wetenschap, te worden menschen van karakter, geschikt voor het maatschappelijk leven.

Onder de personen, die een grooten invloed op mijn ontwikkeling hebben gehad, ben ik in de allereerste plaats, U, Hooggeleerde GILTAY meer dan gewoon dankbaar. De wondermooie colleges leerden ons zelf-denken en kritiek; zij waren in hun eenvoud en starre logika, toch vol gevoel en vol warmte. Zoo zijt Gij het geweest, die niet alleen de studie der biologische wetenschappen voor goed in het centrum mijner belangstelling hebt geplaatst, maar Gij hebt mij daarnaast veel meegegeven voor mijn gansche leven en voor heel de wereld.

Ook U, geachte Heer WOLDA ben ik dankbaar, omdat ik gedurende onze vele gesprekken een uitgebreide oefening heb gehad in biologisch denken. En daarbij heb ik van U geleerd, dat hoewel vooral ook in de biologische wetenschappen met wiskundige nauwkeurigheid het voor en het tegen moet worden overwogen, er toch nu en dan momenten moeten komen, waarop we niet mogen schromen een sprong met ons denken te maken.

Dat de natuurwetenschappelijke problemen zonder vertrouwdsheid met het experiment niet zijn op te lossen, hebt Gij, Hooggeleerde BLAAUW mij voorgehouden. De vele jaren, waarin ik onder Uw leiding op Uw laboratorium heb gewerkt, leveren voor mij de prettigste herinneringen, welke ik aan Wageningen zal behouden. Behalve dat, zijt Ge voor mij meer geweest, en Ge weet, hoe onaangenaam het mij eerst was, toen ik bemerkte, dat dit onderzoek zich meer in chemische richting ontwikkelde, waardoor U niet mijn promotor zou willen zijn.

Ik had, Hooggeleerde ABERSON, Hooggeachte Promotor, reeds ondervonden, dat Uw colleges tot die behooren, waarop men meer leert, dan in boeken te vinden is. En tenslotte zijn het ook deze groote kennis op het uitgebreide gebied der Landbouwscheikunde en Biochemie, en vooral Uw groote werkkraft geweest, welke een nieuwe prikkel en aanmoediging voor mijn eigen werk zijn geworden. De wijze, waarop ik een jaar lang op Uw laboratorium heb kunnen werken, zal bij mij steeds in aangename herinnering blijven.

INHOUD.

	Blz.
I. Inleiding	1
II. Methode van opkweken der proefplanten. Methode der kwantitatieve bepaling van monosen, saccharose, maltose en zetmeel in plantenmateriaal	6
III. Algemeene beschouwingen over het voorkomen, het vormen en het verdwijnen van zetmeel in het Tabaks- blad	25
IV. Eenige proeven over den invloed der voorbehandeling op de omzettingen der koolhydraten in het Tabaksblad	31
V. Proeven over de vorming van zetmeel bij 28° C. door assimilatie	36
VI. Proeven over de vorming van zetmeel bij 28° C. uit suikeroplossingen	42
VII. De beteekenis der koolhydraten bij het voedseltransport	60
VIII. Proeven over de vorming van zetmeel uit suiker- oplossingen bij 1½° C.	64
IX. Het verdwijnen van het zetmeel in bladen bij ver- schillende temperaturen	68
X. De versnelde omzetting van zetmeel bij uitdrogen en andere verschijnselen, welke hiermede verband houden	82
XI. De ophooping van zetmeel in bladen van mozaiekzieke Tabak, bladrolzieke Aardappels en andere viruszieke planten	94
XII. Veranderingen bij het drogings- en fermentatieproces, meer speciaal in het koolhydratengehalte	101
XIII. Referat: Der Kohlenhydratstoffwechsel im Laubblatt von <i>Nicotiana tabacum</i> L.	115
XIV. Litteratuur	138

I. INLEIDING.

De rol der koolhydraten in het stofwisselingsproces der planten, speciaal in de bladen, waarin ze door assimilatie ontstaan, is van zulk een overwegende beteekenis, dat een groot aantal onderzoekers zich met dit onderwerp hebben bezig gehouden. Wanneer men de zeer vele publicaties erover doorleest valt het op, dat bij vrijwel al deze proeven geen moeite is gedaan, om te werken met constante temperatuur en vochtigheid, en dat de resultaten dikwijls verkregen werden met planten, welke buiten op een veld waren opgekweekt, waar zij dus onder zeer variabele en niet te controleeren omstandigheden opgroeiden. Terecht zegt CZAPEK (16)¹⁾ in zijn „Biochemie der Pflanzen” over de suikerbepalingen in bladen: „Die meisten quantitativen Zuckerbestimmungen in Blättern sind eines groszen Teiles ihres Wertes dadurch beraubt, dasz auf Tageszeit, Temperatur und andere die Assimilationstätigkeit beeinflussende Momente in den Resultaten nicht Rücksicht genommen wurde”.

En tenslotte berust thans ons heele inzicht in de zetmeelomzetting en het suikertransport, zegt CZAPEK, nog voornamelijk op de uitkomsten van de proeven van SACHS en SCHIMPER (pag. 485, Biochemie d. Pfl. I, 2de druk), waaraan nog BROWN en MORRIS (10) behooren te worden toegevoegd. Als wij nu weten, dat SACHS (76) en SCHIMPER (78) hun theorieën opbouwden met behulp van kleuringsmethodes, waarbij de eerste b.v. nog aannam, dat zetmeel het eenige assimilatie-product was, en dat dit aan het transport deel nam, dan acht ik het de moeite waard met chemische methoden en met bladmateriaal, dat een meer gelijke voorbehandeling heeft ontvangen, de koolhydraatomzettingen opnieuw na te gaan, en bij de verklaring tegelijk rekening te houden met meer moderne begrippen

¹⁾ De tusschen haakjes geplaatste nummers verwijzen naar 't litteratuur-overzicht.

der plantenphysiologie dan dit ten tijde van SACHS mogelijk was.

Zooals gezegd, werden de proeven van SACHS in 1888, zoowel als die van BROWN en MORRIS in 1893, genomen met planten, welke buiten waren opgegroeid. Nu kwam bij de experimenten van MATTHAEI (47) in 1904 over de sterkte der assimilatie van *Prunus lauro-cerasus*-bladen aan 't licht, welk een buitengewoon grooten invloed de voorbehandeling op de proefuitkomsten heeft. „Thus it is not sufficient to place plants under constant conditions, their whole previous treatment must also have been similar”, zegt MATTHAEI en dit is een aanwijzing, dat ook bij onze bestudeering van de koolhydraatomzettingen in het blad hiermede rekening moet worden gehouden. Reeds BROWN en MORRIS meenden te kunnen aantoonen, dat door in het donker houden het diastatisch gehalte der bladen, hetwelk o.a. het evenwicht zetmeel \rightleftharpoons suiker regelt, gewijzigd wordt. En ik zal zelf bewijzen, dat de lichtsterkte, vochtigheidstoestand en temperatuur, waaraan de bladen van te voren blootgesteld zijn, dit evenwicht zeer belangrijk kunnen verschuiven, en ook, dat bladen van verschillende leeftijd ongelijke resultaten geven.

Het hoeft ons dan ook niet meer te verwonderen, dat bij proeven met bladen van veldplanten een groote variabiliteit in zetmeelgehalte, suikergehalte, zetmeelomzetting, enz. optreedt. Zoo begripen we dat SACHS zegt (74): ook bij eenzelfde plant „kommen Fälle vor, wie ich nämlich wiederholt bei *Tropaeolum* fand, wo ganz gleichartig aussehende Blätter eines und desselben Sprosses sich doch ganz verschieden verhalten; das eine war an Stärke reich, zu derselben Zeit, wo das andere Stärkearm oder sogar Stärkefrei war”. Wanneer wij een veld met *Tropaeolum* bekijken verwondert ons dit resultaat, dat ik zelf eveneens heb waargenomen, niet. Want niet alleen zijn daar de bladen van verschillende leeftijd, niet alleen is de assimilatie reeds zeer verschillend door den stand der bladen, de beschaduwing, enz., maar ook is het vooral de (ongelijke) intensiteit der bestraling, die zoowel belichting en verdamping (uitdroging) regelt, en hierdoor zelfs bij gelijken toevoer van assimilaten een zeer verschillende zetmeelvorming bewerkt. Het is reeds een betrekkelijk geringe uitdroging, welke de vorming van zetmeel uit suikers geheel kan remmen.

Als SACHS nu met zulk materiaal den invloed der temperatuur op den afvoer in het blad (welke hij ten onrechte met de zetmeelverdwijning identificeert) wil nagaan onder invloed van de zeer groote temperatuursschommelingen in ons gematigd klimaat, kunnen zijn uitkomsten m.i. thans niet meer dan orienteerende

waarde bezitten. Bijvoorbeeld concludeert SACHS, dat de zetmeelafvoer „um so energischer geschieht je höher die Temperatur ist” uit „das Verhalten von Pflanzen in freier Luft bei sehr hoher Sonnentemperatur”. Bij die hooge temperatuur bevatten de bladen dan volgens hem 's middags minder zetmeel dan 's morgens, in tegenstelling tot een dag met een temperatuur van 20—25° C., toen 's middags het zetmeelgehalte hooger bleek. Het staat echter buiten twijfel vast, dat 't bij die hooge temperatuur de uitdroging is (waardoor zoowel geremde assimilatie door sluiten der huidmondjes¹⁾, als verlies van de zetmeelvormende eigenschap optreedt), die voor de zetmeelafname aansprakelijk moet worden gesteld. Evenzoo zegt ons het feit, dat Tropaeolumbladen 's middags om 4 uur bij 33° C. zetmeelvrij, een anderen dag bij 27° C. vol zetmeel waren, ten eenemale niets over de snelheid van den assimilatenafvoer. Laat men bij voldoende vochtigheid, gelijk voorbehandelde bladen, bij deze temperaturen in de zon assimileeren, dan neemt het zetmeelgehalte in den loop van den dag in beide toe. Als SACHS dus 's middags de bladen desondanks zonder zetmeel vindt, moet dit aan andere oorzaken, dan die van den afvoer, worden toegeschreven.

Ook in Indië heeft men, wat de variabiliteit van het zetmeelgehalte betreft, precies dezelfde ervaring opgedaan, als SACHS in Europa. Zoo merkt JUL. MOHR (53), sprekende over *Nicotiana tabacum* in Indië op, „dat men dikwijls bladen vindt, die 's morgens vol zetmeel zijn, te midden van andere die ledig zijn; en na een dag zonneschijn 's avonds bladen vrij van zetmeel te midden van andere, welke vol zijn.” En ook COSTERUS (14) kwam te Buitenzorg tot kritiek op de resultaten van SACHS, op grond van de ongelijke omstandigheden, waaraan de planten buiten blootstaan. Het is o.a. makkelijk waarneembaar „that the leaves of a shrub produce very different quantities of food, according as they occupy an Eastern or a Western position”.

Bedenken wij nu, dat in een assimileerend blad tegelijk plaats hebben: vorming van assimilaten (suiker, zetmeel, tannine, eiwitten en misschien nog meer andere verbindingen), afvoer van organische verbindingen, groei en ademhaling, die wellicht ieder weer anders op de uiterlijke omstandigheden reageeren, dan wordt 't duidelijk:

1ste: dat de toe- of afname van één verbinding (bij SACHS zet-

¹⁾ We weten thans door de onderzoekingen van THODAY (85) dat zelfs een geringe slapte van *Helianthus*bladen, die slechts even met het oog waarneembaar of die nauwelijks te voelen is, de assimilatie sterk vermindert door sluiting der huidmondjes.

meel) niets bewijst over vermeerderde of verminderde werking van één der andere processen (bij SACHS assimilaten-afvoer);

2de: dat, wil men kans hebben ondanks de ingewikkeldheid van de tegelijk naast elkaar plaats grijpende processen, toch eenige regulariteiten te ontdekken, het absoluut noodzakelijk is de voorbehandeling zoo gelijkmatig mogelijk te doen wezen en te werken met materiaal van denzelfden leeftijd.

Doet men dit niet, dan vindt men verwarrende uitkomsten, zooals SACHS en anderen. En wanneer men dan bovendien nog zou willen trachten de omzetting suiker \rightleftharpoons zetmeel als zuiver chemisch evenwicht te verklaren, dan geraakt men met LUNDEGÅRDH (46) tot het ontmoedigende resultaat, dat het zelfs absoluut nog niet bewezen zou zijn, „dasz die Konzentration des Zuckers im Zellsaft einen unmittelbaren Einflusz auf die Bildung oder Auflösung der Stärke ausübe”. Door verschillende feiten, zooals het voorkomen van weinig zetmeel in „suikerplanten” en omgekeerd het voorkomen van slechts geringe hoeveelheden suiker in „zetmeel-planten”, komt ook wel eens de twijfel op, of er eigenlijk wel eenig verband bestaat tusschen suiker en zetmeel in de plant. Uit twee eenvoudige proeven treedt dit verband echter met ondubbelzinnige zekerheid naar voren. Als we gelijk voorbehandelde bladen van eenzelfde plantensoort, nadat deze hun zetmeel in het donker verloren hebben, in verschillende glucose- of saccharoseconcentraties leggen bij b.v. 28° C., dan vormt zich meer zetmeel naar mate deze (tot een zekere grensconcentratie) hooger zijn. En als we ten tweede een blad, dat vrij van zetmeel is, met het negatief eener fotografische plaat bedekken en aan een belichting bloot stellen, ontstaat op de plaatsen waar het meeste licht wordt doorgelaten en waar dus de meeste suiker wordt gevormd, ook het meeste zetmeel, zoodat men zelfs de fijnere nuances van een foto met de Jodiumproef kan te voorschijn halen (vgl. MOLISCH, 55).

Het evenwicht: suiker \rightleftharpoons zetmeel is echter geen eenvoudig scheikundig evenwicht. Dit volgt al uit het feit, dat het niet gelukt is, om buiten de plantencel zetmeel uit suiker te doen ontstaan. Zonder twijfel nemen dan ook enzymen deel aan het proces. Wanneer men het afbreken van zetmeel (tot suikers) betitelt met den naam van Hydrolyse, ligt hieraan de chemische overweging ten grondslag, dat $(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O = nC_6H_{12}O_6$. Neemt men echter desondanks, zooals we zullen zien, waar, dat wateronttrekking bij bladen de zetmeelomzetting bevordert, dan wordt het opnieuw duidelijk, dat dit evenwicht geen eenvoudig chemisch proces is. Het zijn

vooral de enzymverhoudingen, die het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker beheerschen. In z.g. „Zetmeelplanten” zijn deze zoodanig, dat het evenwicht in de richting van zetmeelopbouw begunstigd is, en suikers onder deze omstandigheden bijna niet blijvend bestaanbaar zijn. Bij Suikerplanten, is 't omgekeerde 't geval. Men moet dus de verschillende plantensoorten bij de bestudeering van het koolhydratenevenwicht uiteen houden. Maar ook bij één plantensoort kan men de enzymverhoudingen soms beïnvloeden door allerlei uiterlijke omstandigheden, zooals licht, temperatuur, vochtigheid, zouten, enz.

Door al deze overwegingen werd ik er toe geleid, voornamelijk te werken met één plantensoort onder zoo gelijkmatig mogelijke voorwaarden opgekweekt, en slechts bladen van één leeftijd voor de proeven te gebruiken.

II. METHODE VAN OPKWEKEN DER PROEFPLANTEN. METHODE DER KWANTITATIEVE BEPALING VAN MONOSEN, SACCHAROSE, MALTOSE EN ZETMEEL IN PLANTENMATERIAAL.

HET OPKWEKEN DER PROEFPLANTEN.

Nadat uit proeven met bladen van buiten opgegroeide planten gebleken was, dat ze om de in het vorige hoofdstuk aangegeven redenen, niet voor het onderzoek konden worden gebruikt, werd overgegaan tot kweken in meer constante omstandigheden. Het Laboratorium voor Plantenphysiologisch Onderzoek te Wageningen heeft een reeks kamers met thermostaten, waarin de temperatuur tot op enkele tienden van graden Celsius doorlopend dezelfde blijft. De vochtigheidstoestand was in deze thermostaten door plaatsen van bakken met ongebluschte kalk of met water voldoende te regelen. Bovendien was ook kasruimte aanwezig, waar temperatuur en vochtigheid aan geringe schommelingen onderhevig waren. De belichting, waaronder de proefplanten in de kas opgroeiden, was het eenig variabele element. Echter werden de planten alleen in de maanden Februari—Maart en September—October opgekweekt, zoodat tenminste ook de duur der dagelijksche belichting ongeveer dezelfde was. Na langdurige voorproeven werd de volgende werkwijze het geschiktst geoordeeld.

Er werd geëxperimenteerd met *Nicotiana tabacum* en wel met een z.g. „Amerongsche” variëteit. Een paar maal werden enkele proeven eveneens met *Tropaeolum majus* uitgevoerd. Van al de geprobeerde planten, bewees Tabak zich als het meest voor deze proeven geeigend. De planten laten zich makkelijk kweken en leveren bij onze laboratorium-omstandigheden normaal uitziende exemplaren. Bij jonge planten krijgen we reeds een vrij belangrijke bladhoeveelheid, terwijl de bladen elkaar niet béschaduwen. In dit stadium leenen zij zich zeer goed voor een assimi-

latieproef, daar de horizontale stand der bladen bij het loodrecht opwerpen van een lichtbundel een gelijkmatige belichting van het bladoppervlak mogelijk maakt. Een ander voordeel van de *Nicotiana*-bladen was het vrij gelijkmatige verdwijnen van zetmeel bij plaatsen in het donker. *Tropaeolum*, waarmee vele andere onderzoekers (SACHS, BROWN en MORRIS, GAST, SCHROEDER en HORN, MOLISCH) werkten en dat daarom ook gaarne door mij voor het verder onderzoek zou zijn gebezigd, geeft in dit opzicht zulke groote verschillen tusschen spons- en palissadenparenchym te zien, dat het mij een zeer ongeschikt object voor dit onderzoek toeleek. Reeds SACHS wees er op, dat de achterzijde van het *Tropaeolum*-blad veel langzamer zijn zetmeel verliest dan de voorzijde, waaruit blijkt, dat het koolhydratenevenwicht in spons- en palissadenparenchym zeer verschillend is, waardoor niet alleen de sterkte der zetmeelverdwijning met de Jodiumproef zeer lastig is te schatten, maar ook de resultaten der koolhydraatbepalingen in beide zoo verschillend in dit opzicht zich gedragende weefsels geen groote kans biedt, duidelijke resultaten op te leveren.

Een ander voordeel is, dat het Tabaksblad bij koken met 96 % alcohol snel zijn chlorophylkleurstoffen verliest, wat bij vele andere bladen (b.v. *Prunus laurocerasus*) niet zoo gemakkelijk gebeurt. Bovendien is *Nicotiana* een belangrijk cultuurgewas.

In de kas, waar de Tabak werd opgekweekt, was de temperatuur omstreeks 22° C. Door geregeld sproeien en begieten werd de vochtigheidstoestand hoog gehouden en voorkomen, dat zelfs bij sterke bezonning slap worden der bladen optrad. De belichting was diffuus, en voor de diverse bladen zeer gelijkmatig. Van de jonge kiemplantjes werden er 5 in één pot overgeplant in z.g. Lisser grond ¹⁾. Op den leeftijd, waarop ze voor de proeven werden gebezigd, n.l. als behalve 2 cotyledonen en 4 overgangsbladen nog een 4-tal iets grotere normale bladen aanwezig waren, beschaduwden de planten elkaar niet en konden de wortels zich vrij en volledig in de potten ontwikkelen. In eenige gevallen, waarbij ook nog enkele proeven met volwassen bloeiende planten zouden worden uitgevoerd, werden de planten elk afzonderlijk in een zeer grooten pot met denzelfden Lisser-grond geplaatst. Zij ontwikkelden zich dan tot mooie normale planten.

Bij de voorproeven bleek, dat de 4 eerste normale bladen zich ten opzichte van de zetmeelomzetting nu zeer overeenkomstig gedroegen en de groote variabiliteit was op deze wijze dus uitgeschakeld.

¹⁾ Een mengsel van zand, humus en klei.

Verdere proeven maakten uit, dat bedoelde bladen, als zij na een niet te donkeren, maar ook niet te zonnigen dag van de maanden September—October of Februari—Maart, zetmeel hadden gevormd en om 4 uur 's middag in het donker, bij 28° C. en een vochtigheidstoestand van $\pm 75\%$ werden overgebracht, den volgenden morgen tusschen 8 en 10 uur vrij van zetmeel raakten. Om 10 uur konden de bladen dan voor proeven over zetmeelvorming gebruikt worden.

In den zomer was het echter niet mogelijk in één nacht het zetmeel te doen verdwijnen bij deze temperatuur en vochtigheid, zoodat de proeven uitsluitend in bovengenoemde maanden werden uitgevoerd.

Wanneer met *Tropaeolum* werd gewerkt, waren de condities van kweeken hetzelfde. Had de plant een 10-tal bladen, dan werd zij voor de proef gebezigd. 's Middags 4 uur in herfst en voorjaar bij 28° C. in het donker geplaatst, was ook hier juist den volgenden morgen het zetmeel verdwenen.

DE BEPALING DER KOOLHYDRATEN IN PLANTENMATERIAAL.

De bepaling der koolhydraten in plantenmateriaal gaat, vooral wanneer het om kleine hoeveelheden te doen is, gepaard met velerlei moeilijkheden. Voor de beoordeeling der uitkomsten, houd ik een zorgvuldige bespreking der gevolgde methode voor noodzakelijk.

HET DROGEN EN EXTRAHEEREN DER BLADEN.

BROWN en MORRIS droogden hun bladen snel op touwrekken in een droogstoof. Aan DAVIS en DAISH (18) bleek, dat het echter noodzakelijk is vooraf de enzymen in het blad onwerkzaam te maken, omdat anders tijdens het drogen nog belangrijke omzettingen kunnen plaats vinden. Zij zeggen: „if the leaf tissue be dried in a drying oven before destroying the enzymes, during the slow loss of water from the leaf material and before the enzymes are paralysed considerable change may occur”. Daarom is het noodig, „that the enzymes should be destroyed immediately after sampling. Unless this precaution be observed results are obtained which do not in the least represent the amount of actual carbohydrates present in the original leaf”. Zooals we zullen zien, heeft droging, speciaal bij hoogere temperaturen een snelle omzetting van het zetmeel tengevolge. Zoodat hierin een bron van groote fouten kan liggen, vooral als het suikergehalte der bladen gering is en het zetmeelgehalte groot, zooals dat bij onze Tabak en b.v. bij Aardappels het geval

is. Zoo bemerkte WATERMAN (95, 96) dat gedurende het drogen van aardappels in een droogstoof belangrijke hoeveelheden zetmeel tot suikers worden afgebroken. Trouwens ook reeds BROWN en MORRIS (10) ondervonden, dat als zij hun bladen droogden bij 30° à 40° C. het zetmeel zienderoogen afnam. Ook CAMPBELL (12) bij zijn onderzoek naar de koolhydraten van de Bietenbladen vermeldt, dat droging bij 100° C. zonder dan wel na voorafgaande behandeling met chloroform-ether „greatly influenced the sugar content”.

Alleen PARKIN (63) kwam, bij de bepaling van de koolhydraten in bladen van *Galanthus*, tot het resultaat, dat het weinig uitmaakte, of hij voor het drogen de enzymen onwerkzaam maakte. Nu komt echter in de bladen van *Galanthus* geen zetmeel voor, hetgeen zijn resultaat volkomen verklaart. Ook GAST (27) brengt direct na het plukken zijn bladmateriaal „für 7—10 Minuten in den kochenden Dampftopf, um die Enzyme durch die hohe Temperatur unwirksam zu machen”.

Wij komen zoo tot de conclusie: *Wil men het drooggewicht der bladen bepalen, dan is het noodzakelijk, in geval zetmeel in het blad voorkomt, de enzymen door alkohol, toluol, chloroform of op andere wijze in 't blad onwerkzaam te maken, omdat anders gedurende de droging bij hooge temperatuur zetmeel tot suikers in belangrijke hoeveelheden kan worden omgezet.*

Als men zijn bladmateriaal vooraf met alkohol, chloroform of op andere wijze behandelt (b.v. ook door kneuzen), treden geen veranderingen meer in het zetmeelgehalte van het blad op. Al blijft de diastase in het blad aanwezig, zooals BROWN en MORRIS bewezen, na de bedoelde behandeling wordt het zetmeel wellicht door het coaguleeren der celinhoud, er niet meer door aangetast.

Mijn werkwijze was nu de volgende. Het versch verzamelde bladmateriaal, werd nadat het direct gewogen was (verschgewichtbepaling), in een fleschje gebracht en met kokende 96 % alkohol, benevens een weinig ammoniak (ter voorkoming van rietsuikerinversie gedurende de droging) overgoten. Hierna werd gedroogd in een stoof bij 100° C. tot constant gewicht (drooggewichtsbepaling). Vervolgens werd het fleschje met een wattenprop afgesloten en gesteriliseerd.

Het materiaal op deze wijze in de maanden Febr.—Maart en Sept.—October verzameld en gefixeerd kon bewaard blijven, om in de overige maanden op het Scheikundig Laboratorium der L. H. te worden geanalyseerd.

Nadat vooraf een weinig BaCO_3 (tegen eventueele inversie) aan het fijngemaakte bladpoeder was toegevoegd, werd geextraheerd,

volgens de methode door SCHROEDER en HORN (82) gevolgd. Drie maal achtereen werd het materiaal met gedistilleerd water $\frac{1}{2}$ uur gekookt en dan bleef 't de eerste maal nog een half uur, de tweede maal omstreeks 12 uur en de laatste maal wederom $\frac{1}{2}$ uur staan. De filtraten werden na het uitwasschen vereenigd, terwijl de achtergebleven bladsubstantie voor de bepaling van zetmeel kon worden gebezigd.

DE BEHANDELING VAN HET FILTRAAT.

Behalve suikers bevinden zich in het filtraat waarschijnlijk nog andere reduceerende verbindingen, als organ. zuren, tannine, glucosiden, welke vooraf verwijderd moeten worden. Indien dit niet gebeurt, zooals b.v. door MÜLLER THURGAU (56), MOLISCH (55) e. a. vinden wij te hooge uitkomsten voor de totaal aanwezige suikers, terwijl de onderlinge verhouding der verschillende suikers dan tevens geheel verkeerd uitvalt. Bij inversie met zuren vormen zich dan reduceerende verbindingen (b.v. uit de glucosiden: suikers), terwijl deze toename als gevolg van de inversie der maltose wordt berekend. Zoo zeggen SCHROEDER en HORN (82), die een deel hunner extracten niet met loodacetaat behandelden: „Ein Vergleich der Analysen von gereinigtem und ungereinigtem Extrakt ergab für diesen eine sehr viel stärkere Zunahme des Kupferreduktionsvermögens nach der Salzsäureinversion als für jenen.” Waardoor met „Fehlern der angegebenen Grösse in der Maltosebestimmung die Zahlen für Hexosen gleichfalls wertlos werden”. Dat men op deze wijze geheel verkeerde uitkomsten krijgt, bewees PARKIN (63). Nu meende men, dat door toevoeging van basisch loodacetaat met fructose een niet reduceerende verbinding werd gevormd, omdat men bij toevoeging van overmaat basisch loodacetaat het draaiend vermogen zag vermeederen, als fructose aanwezig was ¹⁾. Echter vond reeds PARKIN dat, „if the basic lead acetate is not added in great excess, but only in sufficient amount to precipitate tannin and allied matters, it has no appreciable effect on the sugar estimations”. DAVIS (20) vond voorts, dat het bas. loodacetaat met fructose in het geheel geen verbinding vormt, maar dat de fructose

¹⁾ Neutraal loodacetaat, dat 't fructose-gehalte niet beïnvloedt kan niet gebruikt worden. DAVIS (20) zegt: „the normal acetate is far less effective as a clarifying agent and it frequently leaves in solution optical active substances, such as gums, which are completely eliminated by the basic acetate and thus prevented from interfering with the analysis”.

evenals onder invloed van loodhydroxyde wordt omgezet tot glucose, hetwelk optisch inactief is, en ongeveer de helft van het reductievermogen van glucose bezit. Voegt men echter het basisch loodacetaat in geringe overmaat toe, dan heeft bij kamertemperatuur deze omzetting heel langzaam plaats. Na 24 uur vond DAVIS nog maar 20 % omgezet. Op de veel stabielere glucose en saccharose heeft het bas. loodacetaat geen invloed. Indien men er nu voor zorgt:

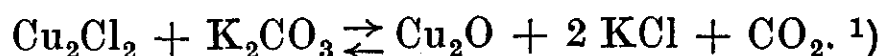
1. geen overmaat toe te voegen;
2. niet te werken bij hoge temperatuur;
3. direct na filtratie de overmaat lood b.v. met Na_2CO_3 weg te nemen, dan treden bij de bepaling geen fouten van eenige betekenis op.

Bij het filtraat voegde ik nu bij gewone temperatuur zeer voorzichtig druppelsgewijs basisch loodacetaat, totdat geen nieuw neerslag werd gevormd. Op deze wijze werd de overmaat tot slechts 2 of 3 druppels beperkt. Aan het filtraat hiervan werd direct een geringe overmaat Na_2CO_3 toegevoegd. Het neerslag werd goed uitgewaschen, waarop de vloeistof werd ingedampt en tot een volume van 100 cc. werd aangevuld. 40 cc. werden gebruikt voor bepalingen van het directe reductievermogen; 25 cc. werden voor inversie van de saccharose gebruikt en wederom 25 cc. dusdanig behandeld, dat bovendien nog de maltose werd geïnverteerd. De inversiemethoden verdienen een nauwkeurige bespreking, daar zij veelal de oorzaak van verkeerde uitkomsten zijn. Alvorens hiertoe over te gaan, wil ik de methode van BANG, welke door mij gevolgd werd, ter bepaling van het reductievermogen, behandelen.

DE BEPALING VAN REDUCEERENDE SUIKERS VOLGENS DE METHODE VAN BANG.

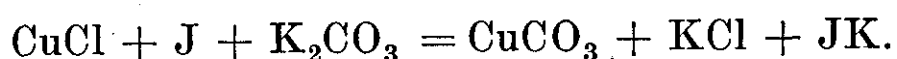
Door BANG (2) is in het Biochem. Zeitschrift, Bd. 49, een methode beschreven ter bepaling van geringe hoeveelheden glucose, welke op de reduceerende werking berust, die glucose op cupriverbindingen uitoefent.

De kopersulfaatoplossing, welke door de glucose wordt gereduceerd bevat bovendien KHCO_3 en K_2CO_3 en KCl . Dit KCl houdt, indien in overmaat aanwezig, het cupro-oxyd in den vorm van cuprochloride, hetwelk tevens in KCl oplosbaar is.



¹⁾ Deze en de volgende vergelijking zijn een eenvoudige voorstelling van wat er gebeurt. In werkelijkheid ontstaan er complexe verbindingen van Cu.

Kookt men nu glucose een bepaalden tijd met een bepaalde sterkte der koperoplossing en koelt men onder afsluiting der lucht af, dan kan men de cuproverbinding weder tot cupriverbinding oxydeeren, door het toevoegen van Iodium. In een alkalische oplossing treedt namelijk de volgende reactie op:



Voegt men nu nog zetmeel aan de oplossing toe ¹⁾, dan kan men bepalen, tot hoelang men met Iodium moet titreeren, om de totale hoeveelheid cuproverbinding te oxydeeren. Is al het koper geoxydeerd, dan slaat de blauwe kleur der oplossing in donkerblauw om, door het optreden van het neerslag, dat Iodium met zetmeel vormt. Onder nauwkeurig omschreven voorwaarden kan men nu empirisch een verband vast stellen tusschen de hoeveelheid in de oplossing aanwezige glucose en de benodigde hoeveelheid Iodium van b.v. 1/100 N welke toegevoegd moet worden, om de kleuromslag te verkrijgen.

Met deze methode is het mogelijk een enkele milligram glucose reeds nauwkeurig te bepalen. Ik heb er voor gezorgd, ook de hoeveelheid te koken vloeistof op een constant volume te brengen, n.l. op 70 cc. We namen daartoe 50 cc. der door BANG voorgeschreven koperoplossing, vermeerderd met eenige cc. der te onderzoeken suikeroplossing en vulden dan met verzadigd KCl bij tot 70 cc. De voor glucose verkregen uitkomsten waren in overeenstemming met de resultaten van BANG.

Daar fructose vrijwel eenzelfde reductievermogen heeft als glucose, is deze suiker met precies dezelfde tabel te bepalen. Door voorafgaande inversie van saccharose laat zich ook deze volgens de methode BANG kwantitatief berekenen.

Maltose reduceert de koperoplossing minder dan de monosen en ik wilde daarom empirisch een tabel opstellen voor de berekening der maltosehoeveelheid.

50 cc. der door BANG (2) voorgeschreven koperoplossing worden juist volkomen gereduceerd door omstreeks $9\frac{1}{2}$ mGr. glucose onder de daar beschreven voorwaarden. Het bleek mij nu, dat onder dezelfde voorwaarden 15 mGr. maltose noodig zijn, om al het koper te reduceeren en de oplossing dus juist te ontkleuren. Hieruit volgt, dat het reductievermogen van maltose slechts ongeveer 65% van

¹⁾ Men dient ook alweer een bepaalde hoeveelheid zetmeel toe te voegen, omdat zetmeel een hoeveelheid Iodium verbruikt. Ik nam steeds $\frac{1}{2}$ cc. eener zetmeel-oplossing, waarbij 1 Gr. oplosbaar zetmeel in 100 cc. verzadigd KCl opgelost was.

dat van glucose bedraagt, hetgeen met de uitkomsten o.a. van SCHOORL (80) overeenkomt.

Gaan we echter titreeren, dan blijkt het omslagpunt niet zoo scherp te bepalen als bij glucose. Na eenigen tijd (in 't begin na $\frac{1}{4}$ minuut) slaat de kleur der oplossing terug en moet men weer eenige druppels Iodium toevoegen, om de donkerblauwe kleur opnieuw te krijgen. Zoo kan men een tijd doorgaan, hetgeen de bepaling langdurig maakt. Het zou bovendien voor bepaling in plantenextracten niet mogelijk zijn, zóó lang te titreeren, totdat de kleur niet meer omslaat. Want men moet, zegt BANG, voor glucose zoolang titreeren totdat de kleur omstreeks 15 sec. behouden blijft, waarbij men „von der langsamen, nachschleppenden Entfärbung abstrahiert”. Heeft men nu een mengsel van maltose en glucose, dan behoort men zich aan dit voorschrift te houden, anders zijn de uitgewerkte tabellen voor glucose onbruikbaar.

Daarom heb ik een empirische tabel opgesteld voor de titreering van door maltose gereduceerde koperoplossingen, zóólang, totdat de zetmeel-Iodium-kleuring in 15 sec. niet meer teruggaat door toevoeging van 2 druppels (0.1 cc.) Iodium. Dit omslagpunt is niet zoo nauwkeurig te bepalen als bij glucose. Toch kan men de fout in de uitkomst tot $\pm 2\frac{1}{2}$ % beperken, wat voor de door ons getitreerde kleine hoeveelheden voldoende is.

De door mij voor *Maltose* uitgewerkte tabel laat ik hierbij volgen:

Maltose mGr.	Gem. cc. Iodium 0,01 N gebruikt	Berekende waarde uit de factor 1,385 + 0,40 cc. ¹⁾	Verschil
1	1.72	1.79	+ 7
2	3.02	3.17	+15
4	6.06	5.94	—12
5	7.35	7.33	— 2
6	8.77	8.71	— 6
8	11.48	11.48	0
10	14.25	14.25	0
12	16.93	17.02	+ 9
14	19.53	19.79	+26

Bij 15 mGr. is de oplossing ontkleurd en blijken 20.75 cc. 0.01 N Iodium voor de bedoelde titratie noodig.

¹⁾ 70 cc. der vloeistof (50 cc. koperopl. + 20 cc. verzadigd KCl onttrekken zelf 0.40 cc. Iodium, welke ik in mijn tabel niet aftrek, BANG wel.

Hieruit volgt reeds, dat niet zóólang getitreerd is, totdat alle cuproverbinding is geoxydeerd. Immers 50 cc. koperoplossing bevat (volgens voorschrift) 66 mGr. $\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$. Uit de bovengenoemde vergelijking berekent men nu, dat dit koper, indien geheel gereduceerd, voor volledige oxydatie noodig heeft 0.264 Grmol. Iodium = 26.4 cc. Iodium 0.01 N. Hieruit volgt, dat nog geen 80 % der cuproverbinding was omgezet toen de kleuromslag 15 seconden behouden bleef. Of men zou moeten aannemen, dat een deel der cuproverbinding op andere wijze (b.v. door de zuurstof der lucht) tot cuprizout zou zijn gereduceerd.

In dit verband zijn de resultaten van BANG met glucose verkregen interessant. Hij vindt de volgende uitkomsten (welke verkregen zijn met 55 cc. koperoplossing):

A	B	C ₁	C ₂	D	E	F
Glucose mGr.	Gevonden door titratie	Berekend uit de factor ¹⁾ 2.67	2.70	Gevonden door titratie gedur. CO ₂ - doorleiding	Vershil C ₁ —B	Vershil C ₂ —D
1	2.60	2.67	2.70	2.60	+0.07	+0.10
2	5.25	5.34	5.40	5.40	+0.11	0
3	8.10	8.01	8.10	8.00	—0.09	+0.10
4	10.85	10.68	10.80	11.30	—0.17	—0.50
5	13.55	13.35	13.50	13.80	—0.20	—0.30
6	16.25	16.02	16.20	16.50	—0.23	—0.30
7	18.85	18.69	18.90	19.85	—0.16	—0.95
8	21.40	21.36	21.60	22.00	+0.04	—0.40
9	23.60	24.03	24.30	24.30	+0.43	0
10	25.65	26.70	27.00	26.10	+1.05	+0.90

Bij 10 mGr. glucose zijn de 55 cc. koperoplossing juist ontkleurd. Volgens de uitgevoerde berekening zou voor volledige oxydatie hiervan noodig zijn 29.0 cc. 0.01 N Iodium.

Wij zien, dat bij 't doorleiden van CO₂ gedurende de titratie, waardoor luchtoxydatie wordt voorkomen, nog slechts 90 % van de theoretische hoeveelheid Iodium voor titreeren tot het omslagpunt wordt verbruikt, zonder doorleiden van CO₂ : 88 %.

Men bemerkt hieruit, dat het verschijnsel dus ook bij glucose voorkomt, al is dit in niet zoo sterke mate als bij maltose; en voorts, dat de cuproverbindingen ook zonder 't doorleiden van koolzuur niet door de luchtoxydatie in eenigszins belangrijke mate worden

¹⁾ Zie noot vorige bladzijde.

geoxydeerd. Door maltose schijnt 20 % en door glucose 10 % in cuproverbindingen te zijn gereduceerd, welke slechts langzaam en moeilijk worden omgezet tot cupri-oxyde. Men komt hierdoor tot de conclusie, dat bij de reductie door suikers waarschijnlijk *verschillende* cuproverbindingen worden gevormd, en niet alleen en eenvoudig CuCl .

Tevens zien we, dat noch bij glucose noch bij maltose de benoedigde Iodiumhoeveelheid evenredig verloopt met de hoeveelheid reduceerende suiker. Niet alleen is, zooals BANG en ook SCHOORL opmerken bij de grootste hoeveelheden suiker de benoedigde Iodiumhoeveelheid kleiner dan dit bij een lineair verband het geval zou wezen, hetzelfde is tevens het geval bij de kleinste hoeveelheden (1 en 2 mGr. maltose en 1,2 en 3 mGr. glucose).

BANG meent, dat het de luchtoxydatie is, die zich bij hogere suikerconcentraties meer zou laten gelden. Maar ook bij het doorleiden van CO_2 treedt het verschijnsel op en evenzoo bij de kleinste concentraties.

SCHOORL wijt het daaraan, dat bij grootere hoeveelheden suiker niet alleen relatief minder katalysator, maar ook een geringere koperconcentratie overblijft, zoodat in den begrensden tijd minder sterk geoxydeerd kan worden. Ook dit kan maar gedeeltelijk de verklaring van het niet-lineair zijn der functie wezen, want het kan de afwijking van 't verloop bij de kleinste suikerhoeveelheden niet verklaren. Veel-

eer moeten we ook wederom rekening houden met de snelheid der reductie van de gevormde cuprozouten, zóó dat bij kleine suikerconcentraties meer moeilijk oxydeerbare cuproverbindingen gevormd worden, dan bij middelmatig hoge concentraties.

In ieder geval bewijst het opnieuw, dat de reductiewerking, welke suikers op het cuprizout uitoefenen zich niet door één eenvoudige vergelijking laat weergeven. En dat er dus voor gezorgd dient te worden, dat de reactie onder nauwkeurig omschreven omstandigheden wordt bestudeerd en de zoo empirisch verkregen uitkomsten worden toegepast op proeven, welke onder precies dezelfde voor-
schriften zijn verlopen.

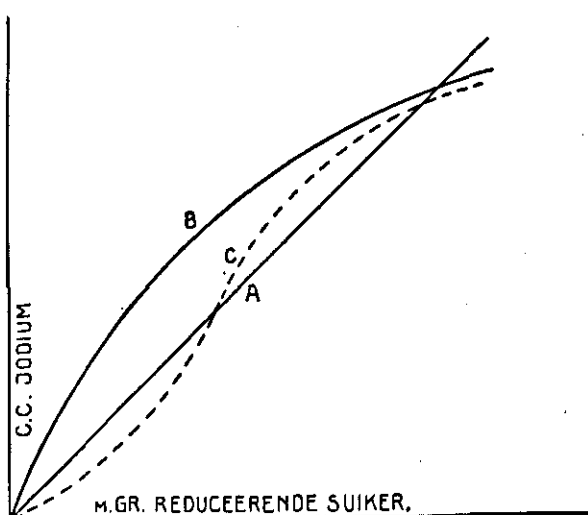


FIG. 1.

- a = lineair verband.
- b = verband zooals BANG en SCHOORL voorstellen.
- c = verband zooals de uitkomsten dat ons leeren.

Schematisch verband tusschen hoeveelheid reduceerende suiker en Iodiumhoeveelheid.

DE INVERSIE VAN DE SACCHAROSE EN VAN DE MALTOSE.

Glucose, fructose en maltose reduceeren FEHLING's proefvocht. Beide eerste suikers vrijwel even sterk, maar maltose zooals we zagen minder dan genoemde monosen; saccharose geeft geen reductie met Fehling. Het is nu de bedoeling na de bepaling van het direct reduceerende vermogen (monosen + maltose), de saccharose te inverteeren tot fructose en glucose, maar daarbij de maltose onaangetast te laten. Uit de toename van het reduceerende vermogen is dan de hoeveelheid rietsuiker af te leiden. Vervolgens moet door een andere inversie-methode behalve de rietsuiker ook de maltose worden gesplitst tot 2 mol. monosen. Daar glucose meer reduceert dan maltose valt uit de nieuwe toename in het reduceerend vermogen ook de maltose af te leiden, terwijl de rest der suikers dan glucose en fructose is, die door ons niet afzonderlijk zijn bepaald, maar gezamenlijk als monosen worden berekend.

Het vinden van geschikte inversie-methoden, is niet zoo eenvoudig. BROWN en MORRIS (10) kookten voor de inversie der maltose in een waterbad 3 uur met N HCl; GAST (27) werkte met gisten, terwijl HORN (33) en AHRNS (1) $\frac{1}{2}$ uur kookten met N HCl.

Bij het koken met dergelijke HCl-concentraties wordt echter een deel der aanwezige monosen gedestruëerd, zoodat foutieve uitkomsten het gevolg zijn. DAVIS en DAISH (18) hebben de verschillende inversiemethoden nauwkeurig bestudeerd. Wat de *Inversie der saccharose* betreft, is volgens deze onderzoekers de methode om bij 70° C. te inverteeren met HCl volgens Herzfeld's voorschrift niet te gebruiken, omdat door dit zuur volgens hen eveneens maltose voor een belangrijk deel wordt gesplitst tot glucose. Daarom zou met zwakke zuren, zooals oxaalzuur en citroenzuur gewerkt moeten worden. En ze komen tot het resultaat, dat het beter is met 10 % citroenzuur 10 minuten te koken.

Deze resultaten van DAVIS en DAISH (17 en 18) zijn echter voor kritiek vatbaar. Waar het bij de inversie tenslotte de H-ionen concentratie is, die de omzetting teweeg brengt, lijkt het van weinig beteekenis, welk zuur men gebruikt, omdat als men ervoor zorgt, dat men van beide zulke concentraties toevoegt, dat de H-ionen concentratie dezelfde is, de inversie van de verschillende suikers ook op dezelfde wijze verloopt.

Ik heb nu de twee methodes met elkaar vergeleken en ben tot de conclusie gekomen, dat de inversie met HCl te verkiezen is boven die met citroenzuur, en dat de laatste methode bij aanwezigheid van zeer kleine hoeveelheden suikers zelfs geheel verkeerde uitkomsten

levert. De oorzaak ervan is, dat citroenzuur bij neutralisatie b.v. met Na_2CO_3 Na-citraat levert, waarbij deze citroenzuurrest eveneens Fehling's proefvocht reduceert. Hoe geringer de suikerhoeveelheden in de te bepalen vloeistof zijn, hoe groter natuurlijk de fouten door deze citroenzuurreductie worden.

Wanneer ik maltose-oplossingen van 0.1 en 0.01 % met 10 % citroenzuur 10 minuten kookte, vond ik steeds een belangrijke toename van het reductievermogen en het scheen dus, alsof er maltose in belangrijke hoeveelheden was geïnverteerd in tegenstelling met de uitkomsten van DAVIS en DAISH. Werd echter 25 cc. gedistilleerd water 10 min. gekookt met 2.5 Gr. citroenzuur en achteraf geneutraliseerd met Na_2CO_3 , aangevuld tot 50 cc. en hiervan 20 cc. met 50 cc. koperoplossing volgens BANG behandeld, dan verbruikten 20 cc. hiervan 0.88 cc. Iodium, tegen 0.40 cc. voor een oplossing die geen reduceerende verbindingen bevat. Hierdoor is 't te verklaren, dat wij bij een 0.1 % maltose-oplossing uitkomsten krijgen, die een schijnbare toename van het reductievermogen der suikers van omstreeks 10 % aantoonen, welke reductietoename dus op rekening van het Na-citraat komt. Bij een 0.01 % maltose-oplossing wordt de fout nog groter. Bij een 1 % oplossing zooals DAVIS en DAISH gebruikten, ontstaan echter slechts fouten van 1 of 2 %. Nu vinden wij deze toename van het reduceerend vermogen van maltose-oplossingen eener dergelijke sterkte na behandeling met 10 % citroenzuur ook werkelijk in de uitkomsten van DAVIS en DAISH terug. Zij vonden n.l. na citroenzuurinversie 100,6 %, 101.8 % en 101.6 % der koperreductie van voor inversie, welke kleine toename door hen echter is verklaard als „Slight hydrolysis had occurred”.

Bij inversie van zulke kleine hoeveelheden, als door mij in de extracten van Tabaksblad werden verkregen, zou inversie met citroenzuur echter absoluut verkeerde uitkomsten hebben geleverd. Daarom werd de inversiemethode met HCl in zwakke concentraties bij 70° C. gedurende 5 min. nader onderzocht.

Hoewel DAVIS en DAISH deze zoutzuurinversie uitschakelen, omdat „if maltose is present, a considerable portion also undergoes hydrolysis to dextrose”, zeggen zij zelf eenige pagina's verder „Hydrolysis of maltose in 1 % solution by 2.44 % hydrochloric acid at 70°, is very slow”, terwijl de bijgevoegde proefuitkomsten laten zien, dat na 2 uur pas omstreeks 29 % maltose geïnverteerd is. Daar voor de saccharose-inversie, de temperatuur niet langer dan 5 min. op 70° C. wordt gehouden, kan men niet verwachten, dat de inversie van maltose in dezen tijd in eenigszins beteekenende mate heeft plaats gevonden.

Om dit voor kleine suikerconcentraties nader te onderzoeken, inverteerde ik concentraties van ongeveer 0.1 en 0.01 % maltose met 2.5 % HCl gedurende 5 min. bij 70° C. Na behandeling volgens BANG leverde de titratie:

Bij een ongeveer 0.01 % maltose-oplossing:

voor inversie verbruikt door 10 cc.....	1.53 cc. Iodium
na HCl-inversie door overeenkomstige hoeveelheid	1.56 cc. „

Bij een ongeveer 0.1 % maltose-oplossing werd gevonden:

verbruikt door 2 cc. vóór inversie	3.18 cc. „
verbruikt door overeenkomstige hoeveelheid na HCl inversie	3.14 cc. „

De eventuele inversie der maltose blijkt van een zoodanige grootte, dat ze binnen het gebied mijner titratiefouten valt.

De invloed van het behandelen met 2.5 % HCl gedurende 5 min. bij 70° C. op de *saccharose* werd eveneens nagegaan.

Een oplossing van precies 0.1 % *saccharose* verbruikte in 2 cc. na een dergelijke behandeling en reductie volgens BANG een hoeveelheid Iodium, welke met 2.06 mGr. glucose overeenkwam (tegenover 2 mGr.)

Een precies 0.01 % *saccharose-oplossing* verbruikte in 10 cc. na een dergelijke behandeling en reductie volgen BANG een hoeveelheid Iodium overeenkomende met 0.99 mGr. glucose (terwijl gevonden had moeten worden 1 mGr.).

Ook hier blijken de afwijkingen te vallen binnen de titratiefouten en wij kunnen dan ook zeggen, dat de inversie volledig heeft plaats gehad, terwijl gedurende 't koken met de alkalische Bangsche oplossing geen aantoonbare destructie van fructose of glucose heeft plaats gevonden.

Voor de bepaling van kleine hoeveelheden suiker levert inverteeren met 2.5 % zoutzuur gedurende 5 min. bij 70° C. goede uitkomsten, terwijl de inversie met citroenzuur hiervoor onbruikbaar is.

DE INVERSIE DER MALTOSE.

De maltose wordt alleen door vrij langdurig koken met sterk zuur volledig geinverteerd. DAVIS en DAISH (18) toonden echter aan, dat onder deze omstandigheden belangrijke hoeveelheden fructose en daardoor ook *saccharose* worden gedestruëerd tot verbindingen,

welke Fehling's proefvocht niet reduceeren. Daardoor worden de uitkomsten van BROWN en MORRIS, die 3 uur kookten met Normaal HCl wat betreft het maltose en monose-gehalte van betrekkelijk geringe waarde. ¹⁾.

DAVIS bepaalt daarom de hoeveelheid maltose met maltase-vrije gisten.

Daar deze gisten volgens bedoelde onderzoekers 21 tot 28 dagen op de oplossing moeten inwerken, wordt het onderzoek zeer langdurig. Ik heb daarom naar een inversie-methode uitgezien, die wél de maltose voor het grootste gedeelte omzet, maar de fructose voor slechts een onbelangrijk deel destrueert. In het onderzoek van DAVIS en DAISH zijn hiervoor aanwijzingen te vinden. Zij zagen, dat na inwerken van 2.44 % HCl gedurende 24 uur bij 70° C., 94 % der maltose was geïnverteerd. Onder deze omstandigheden was slechts 5 % fructose, maar geen glucose omgezet, en dus niet meer dan omstreeks 2.5 % saccharose gedestruerd. Indien ook bij zulke kleine suikerconcentraties, als door mij onderzocht worden, geen grootere fouten zouden optreden, was deze inversiemethode voor mijn doel goed bruikbaar. Bij zulke kleine hoeveelheden, als waar het bij mijn onderzoek om gaat, zijn fouten van deze grootte niet ernstig. Bovendien kon bij de berekening der maltose ermede rekening worden gehouden, dat niet alle aanwezige maltose (slechts omstreeks 94 %) geïnverteerd wordt. De toename in reductievermogen na inversie, levert het aantal mGr. glucose, dat uit de maltose ontstaan is, hetgeen met een gewichtshoeveelheid maltose overeenstemt, gelijk aan 95 % van de gewichtshoeveelheid glucose ($C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 2 C_6H_{12}O_6$). Daar nu ook slechts ongeveer 95 % der maltose door inversie blijkt te worden omgezet, werd bij onze berekening de gevonden gewichtsvermeerdering der glucose aan de hoeveelheid oorspronkelijk aanwezige maltose gelijk gesteld. Uit onze bepalingen bleek n.l., dat ook bij kleine concentraties van suikers de uitkomsten van DAVIS en DAISH geldig zijn.

Allereerst werd nagegaan de invloed van 3.75 % HCl bij koking, op geringe concentraties saccharose en maltose.

Er werd gevonden:

¹⁾ DAVIS EN DAISH vonden bij 3 uur koken met ruim 4 % HCl: 90 % fructose, 6 % glucose en 47 % rietsuiker gedestruerd, terwijl de maltose voor 95 % in glucose werd omgezet.

	Aant. uren koken met 3.75% HCl			Conc. der suiker
	1/2 uur	2 uur	3 uur	
Gevonden geïnverteerde saccharose als glucose in % der totale hoeveelheid	69 % 66 %	66 % 60 %	59 % 50 %	0.1 % Sacch. 0.01 % „
Omgezette maltose berekend uit gevormde glucose	45 % 43 %	— —	98 % 100 %	0.1 % Malt. 0.01 % „

Zooals blijkt is de destructie van de uit saccharose gevormde monosen onder deze omstandigheden ook zeer sterk, en wel des te sterker naar gelang de concentratie der suikers geringer is. DAVIS vond in een 2 % rietsuikeroplossing na 3 uur koken met 4.71 % HCl omstreeks 47 % der totale hoeveelheid monose aanwezig.

Na 24 uur invertieren met 2.5 % HCl bij 70° C. werd het volgende resultaat verkregen:

Gevonden reductie (berekend als glucose) ten opzichte van de theoretische reductie, wanneer alle saccharose en maltose zouden zijn geïnverteerd zonder destructie, uitgedrukt in procenten:

Saccharose 0.1 %: 98 %;
 Saccharose 0.01 %: 95 %;
 Maltose 0.1 %: 94 %;
 Maltose 0.01 %: 95 %;

Deze methode is dus voor mijn onderzoek goed te gebruiken.

INDICATOREN.

Na het indampen van 't gereinigde bladextract, dat zwak alkalisch was door toevoegen van een geringe overmaat Na_2CO_3 (om het lood weg te nemen), moest alvorens het toevoegen van HCl ter verkrijging van een bepaalde zuurgraad voor inversie, eerst zooveel zuur worden toegevoegd, dat de oplossing neutraal was. Ook na inversie moest wederom worden geneutraliseerd, daar de Bangsche methode in alkalische omgeving dient te geschieden. Het was dus noodig een indicator te gebruiken. Daar het bij mijn onderzoek om reductie van zeer geringe hoeveelheden suikers gaat, bestond de mogelijkheid, dat de toegevoegde indicatoren zelf ook in die mate zouden reduceeren, dat de uitkomst er door beïnvloed kon worden.

Om dit na te gaan werden 2 druppels phenolphthaleïne in 50 cc. gedistilleerd water benevens een weinig Na_2CO_3 opgelost en 20 cc. volgens

BANG behandeld en getitreerd. De vloeistof verbruikte 2.19 cc. Iodium, tegen 0.40 cc. wanneer geen reduceerende verbindingen aanwezig waren. Het blijkt dus hieruit, dat reeds enkele druppels dezer kleurstof zoo sterk reduceeren, dat ze voor mijn onderzoek niet kan worden gebruikt.

Methylrood gaf daarentegen geen reduceerende werking, zoodat ik deze indicator voor mijn proeven gebruikte.

DAVIS EN DAISH (18) gebruikten bij hun onderzoek als indicator phenolphthaleine; daar zij echter met veel geconcentreerdere suikeroplossingen werkten, heeft dit hun proeven waarschijnlijk slechts op ondergeschikte manier beïnvloed.

VOORBEELD TER BEREKENING DER SUIKERHOEVEELHEDEN.

Bladen 4 dagen droog bij $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C.

Het behandelde extract is ingedampt tot 100 cc.

1. 20 cc. worden volgens BANG behandeld. Voor de titratie zijn noodig 1.95 cc. 1.33/100 N Iodiumoplossing.

Aangezien nu de koperoplossing plus het toegevoegde zetmeel steeds 40 cc. 1/100 N Iodium verbruiken of 30 cc. 1.33/100 N J. blijkt, dat reduceerende verbindingen (monose en maltose) aanwezig zijn, welke 1.65 cc. 0.0133 N J verbruiken of de totale oplossing 8.25 cc. 0.0133 N = 11.09 cc. 0.01 N J.

2. 25 cc. der oorspronkelijke tot 100 cc. gebrachte oplossing worden nu 5 min. bij 70° C. met 1.8 cc. HCl van 37 % behandeld, waarna neutralisatie en aanvulling tot 50 cc.

20 cc. dezer laatste oplossing worden nu volgens BANG behandeld. De titratie vordert 1.84 cc. 0.0133 N of wel de reduceerende bestanddeelen (zijnde de oorspronkelijke monosen plus de uit de aanwezige saccharose ontstane monosen en de maltose) 1.54 cc. 0.0133 N. De totale oplossing dus 15.40 cc. 0.0133 N = 20.53 cc. 0.01 N.

3. 25 cc. der oorspronkelijke oplossing worden 24 uur verwarmd met 1.8 cc. 37 % HCl bij 70° C. daarna neutralisatie en aanvulling tot 50 cc.; 20 cc. hiervan verbruiken na behandeling volgens BANG 2.03 cc. 0.0133 N J of de thans geheel tot monose geïnverteerde suikers verbruiken 1.73 cc. J of in de totale oplossing 17.30 cc. 0.0133 N = 23.07 cc. 0.01 N I.

De toename 2—1 aan monosen komt overeen met 9.53: 2.6 mGr.

= 3.65 mGr. monosen, welke overeenkomen met 3.5 mGr. saccharose.

De toename 3—2 levert een maat voor de aanwezige maltose. 1 mGr. maltose verbruikt op zichzelf 1.35 cc. Iodium. Nu levert 1 mGr. maltose bij bovenstaande behandeling 95% der theoretische waarde aan glucose, dus omstreeks ook 1 mGr. glucose, welke 2.60 cc. J 0.01 N verbruikt. Elke toename van 1.25 cc. 0.01 N J bij een dergelijke inversie beteekent de aanwezigheid van 1 mGr. maltose. In ons geval is de toename 2.54 cc. 0.01 N J, d.i. omstreeks 2 mGr. maltose.

2 mGr. maltose reduceeren dus vóór elke inversie 2×1.35 cc. 0.01 N J, m.a.w. 2.70 cc. De rest der benodigde J zijnde 11.00 — 2.70 = 8.30 cc., reduceeren de monosen, welke overeenkomen met $8.3 : 2.6 = 3.2$ mGr. monose.

DE BEPALING VAN HET ZETMEEL.

Het was bij enkele proeven gewenscht om het resultaat, verkregen met de Iodium-proef van SACHS aan te vullen met een kwantitatieve bepaling van het zetmeel.

In het drie maal met water uitgetrokken bladweefsel werd dan door mij het zetmeel bepaald, door dit laatste met diastase tot suikers af te breken. Zooals DAVIS en DAISH (19) aantoonen kan men niet werken met gewone (mout) diastase, zoodra men te doen heeft met plantenextracten, welke met basisch loodacetaat gereinigd behooren te worden, ter verwijdering van de reduceerende verbindingen, die geen suikers zijn. Gewone diastase splitst het zetmeel nl. in een mengsel van maltose en dextrine. Deze dextrine, hoewel zelf niet neer te slaan met basisch loodacetaat, wordt door andere neerslagen (b.v. het neerslag, dat door 't verwijderen van het overmatige lood ontstaat) geabsorbeerd en aan de vloeistof onttrokken. Hierdoor ontstaan, zooals DAVIS en DAISH aantoonen fouten van 20 %.

Takadiastase ontleedt het zetmeel in een mengsel van maltose en glucose. Wanneer wij nu dit mengsel 3 uur koken met 3.75 % HCl wordt alle maltose geïnverteerd tot glucose. De destructie van glucose is hierbij gering (hoogstens enkele procenten).

De methode verliep nu als volgt: het drie maal uitgetrokken bladweefsel werd een half uur met water opgekookt; na afkoeling werd precies 100 mGr. takadiastase ¹⁾ toegevoegd en werd het meng-

¹⁾ Evenals DAVIS en DAISH, gebruikte ik het handelsproduct van Parke Davis & Co.

sel 24 uur bij 38° C. geplaatst. Het was noodig een hoeveelheid toluol toe te voegen, om infectie te voorkomen; men moet de hoeveelheid toluol nu en dan vernieuwen. Gebruik van thymol is af te keuren, omdat de desinfecteerende werking hiervan onvoldoende is, waarop ook MIEHE (52) onlangs gewezen heeft.

Hierna werd het bladweefsel, precies als bij de suikerbepaling, 3 maal uitgetrokken en het verzamelde extract met basisch loodacetaat behandeld en na affiltreeren de overmaat lood weggenomen met Na_2CO_3 . Het filtraat werd aangevuld tot een bepaald volume. Hiervan werd 25 cc. genomen, onder toevoeging van zooveel HCl dat de concentratie 3.75 %-tig werd. Na 3 uur koken (met reflux) werd geneutraliseerd met Na_2CO_3 en na afkoeling op bepaald volume gebracht (50 cc.); 20 cc. werden daarop volgens BANG behandeld en de glucosehoeveelheid bepaald, waaruit het zetmeel te berekenen was. Alleen moet dan nog het reductievermogen van 100 mGr. takadiastase, op dezelfde wijze behandeld, in rekening worden gebracht. De takadiastase¹⁾, en hetzelfde is het geval met gewone diastase, bevat groote hoeveelheden suikers. DAVIS en DAISH hebben hiermede geen rekening gehouden, wat doordat ze met grootere hoeveelheden zetmeel werkten, niet zoo ernstige fouten heeft veroorzaakt.

Een proef welke ik uitvoerde met 100 mGr. gezuiverd zetmeel gaf, op deze wijze behandeld en na aftrek van de reductie door de takadiastase veroorzaakt, volgens onze bepaling 107.2 mGr. glucose, of wel 96.5 mGr. zetmeel. De iets te kleine uitkomst is waarschijnlijk aan destructie van glucose door het koken met HCl te wijten.

Vóór de inversie met HCl bevatte de vloeistof nog vrij veel maltose (berekend uit de reductie vóór en na inversie), de verhouding $\frac{\text{glucose}}{\text{maltose}}$ was 1.3. Door DAVIS en DAISH werd onder dezelfde voorwaarden van diastase-inwerking een verhouding $\frac{\text{glucose}}{\text{maltose}}$ gevonden tusschen 1.157 en 1.345; deze uitkomsten werden verkregen door bepaling van het draaiend vermogen der vloeistof. Zij zijn met de door mij op andere wijze verkregen cijfers in overeenstemming.

DE NAUWKEURIGHEID DER BEPALINGEN VAN KOOLHYDRATEN IN PLANTENMATERIAAL.

Het is duidelijk, dat de bepalingen van koolhydraten zonder voorgaande behandeling van het extract met basisch loodacetaat,

¹⁾ Zie noot vorige bladzijde.

waardoor ook andere reduceerende verbindingen in de oplossing blijven, verkeerde uitkomsten geven. De bepalingen van MÜLLER—THURGAU (57) over het suikergehalte der Aardappels en van gedroogd Tabaksblad verliezen daardoor van hun waarde. Hetzelfde geldt voor de resultaten van MOLISCH (54). Maar ook de uitkomsten van BROWN en MORRIS (10), die droogden zonder voorafgaande doo-ding der enzymen, zoowel als hun verkeerde inversiemethode der maltose, waarbij een vrij groot deel der fructose en saccharose ge-destrueerd wordt, verliezen hierdoor in beteekenis. Hetzelfde geldt voor de resultaten van HORN (33) en van AHRNS (1). Het saccharose-gehalte zal geen bijzondere fouten hierdoor ondervinden, wel echter de verhouding der glucose, fructose en maltose.

De door mij gebezigde methode beperkt deze fouten. Zonder twijfel blijven — zij 't dan kleinere — fouten bestaan door de des-structie van een weinig monosen en saccharose bij de inversie. En ook blijft het steeds mogelijk, dat reduceerende verbindingen, die niet door basisch loodacetaat worden verwijderd en geen suikers zijn, de uitkomsten in de war sturen.

Toch stelt de methode, zooals we zullen bemerken, ons in staat tot het opsporen van feiten, welke met zulke duidelijkheid tot uit-drukking komen, dat twijfel aan hun algemeene geldigheid op zijn minst onwaarschijnlijk is. Al zullen dan fijnere nuanceeringen in 't koolhydratenevenwicht eerst door nog nauwkeuriger methoden tot uitdrukking kunnen komen, voorloopig hebben we geen behoefte hieraan, zoolang ons over dit evenwicht nog zoo weinig bekend is, als op dit oogenblik het geval is.

III. ALGEMEENE BESCHOUWINGEN OVER HET VOORKOMEN, HET VORMEN EN HET VERDWIJNEN VAN ZETMEEL IN HET TABAKSBLAD.

De opbouw van suikers tot zetmeel is alleen mogelijk in de levende plantencel, terwijl de afbraak van het zetmeel ook buiten de plant (zuren, diastase) kan geschieden. Het zijn de door SCHIMPER als plastiden aangeduide plasmatische lichaampjes, welke de zetmeel-opbouwende eigenschap bezitten. Hebben deze geen kleurstof opgenomen, dan noemt SCHIMPER (77) ze leukoplastiden, hebben zij kleurstof tot zich genomen, dan spreekt SCHIMPER van chromoplasten, (b.v. de oranje en gele kleurstoffen uit de bloemen), terwijl hij ze met den naam van chloroplastiden betitelt, wanneer ze meer speciaal de chlorophylkleurstoffen bevatten. De leukoplasten en chloroplasten kunnen in elkaar overgaan, terwijl uit beide de chromoplasten van de bloemen kunnen ontstaan. De leukoplasten ontstaan slechts door deeling uit andere leukoplasten, worden dus niet uit het celplasma gevormd.

MÖBIUS geeft, wat de chloroplasten betreft aan, dat bij de meer dan 100 zeer verschillende planten waarin hij de doorsnede dezer lichaampjes bepaalde, de variabiliteit uiterst gering bleek en slechts weinig van 5 μ verschilde. Wellicht is deze dispersie juist gunstig voor het absorbeeren der groene kleurstoffen. ARTHUR MEYER (51) vond, dat de chloroplasten door een dunne laag homogeen celplasma omgeven zijn, welk cytoplasma ook in strengen de chlorophylkorrels onderling verbindt; van een soort cellulosemembraan om deze korrels is geen sprake. HANS WINKLER (101) heeft het zetmeelvormend vermogen van leukoplasten en chloroplasten vergeleken. Hoewel de kleurloze leukoplasten door het ontbreken van chlorophyl de functie van assimileeren missen, is dit niet met de functie van zetmeelvorming het geval. In den Hyacinthen bol, in den Aardappel wordt b.v. zeer veel zetmeel in de leukoplasten aangetroffen. WINKLER vergeleek bovendien gewone met ge-

ëtiolerde in donker opgegroeide plantendeelen, en hij neemt daarbij noch verschillen in snelheid, noch in sterkte van zetmeelvorming waar, wanneer hij ze in het donker in suikeroplossingen brengt, tenminste zoolang de leukoplasten nog niet aan desorganisatie ten prooi zijn. Nu nam SACHS (76) waar, dat bij de herfstverkleuring der bladen het zetmeel verdwijnt voor het stroma der korrels uiterlijk beschadigd leek. Men moet daarbij niet vergeten, dat de omstandigheden van assimilatie en zetmeelvorming zoo gewijzigd zijn gedurende deze periode, dat wij het uitblijven der zetmeelvorming mogelijk geheel op rekening dier omstandigheden kunnen schuiven. WINKLER meent, dat men het werkelijk geheel in de veranderde omstandigheden moet zoeken, want legt men zulke herfstbladen in suikeroplossingen, dan treedt wederom zetmeel op.

Voorts werkte WINKLER met chlorotische planten, waar de groenkleuring door ijzergebrek achterwege was gebleven. Ook hierbij vormden de bladen uit suikerconcentraties zonder een spoor van ijzer, zetmeel. Opnieuw bewijst dit, dat zetmeelvorming met de groene kleurstof niets te maken heeft.

De verdeling van de chloroplasten in het Tabaksblad is niet gelijkmatig. DE TONI en PAOLETTI (86) hebben de anatomie van de Tabak nagegaan en bij hen vindt men goede bladdoorsneden. In spons- en palissadenparenchym bevinden zich een groote hoeveelheid chloroplasten. Anders is dit in de nerven. Het einde der nerven toont ons als Xyleemgedeelte een tracheïde. Hieromheen heeft zich een rij parenchymatische cellen gedifferentieerd, welke opvallen, doordat zij in een gesloten rij de tracheïde omgeven, en veelal eenigszins in de richting der nerf gestrekt zijn. Deze cellenlaag blijft steeds direct de vaatbundelring omgeven, is nl. de eerste rij der schorscellen, die buiten tegen de zeefvaten aansluit, draagt den naam van Phloeoterma, en wordt ook zetmeelscheede geheeten. Deze cellen zijn zeer rijk aan chloroplasten in tegenstelling tot de overige schorscellen. Reeds iets van het nerveneinde af, wordt het phloeoterma overdekt met steeds meer rijen, in de lengterichting gestrekte vrij groote schorscellen, welke slechts zeer arm aan chlorophylkorrels zijn. Ook de epidermiscellen zijn bij de nerven in de lengterichting gestrekt en bevatten mede een gering aantal chlorophylkorrels.

Wanneer wij nu een blad, dat hetzij door assimilatie, hetzij uit suikeroplossingen, groote hoeveelheden zetmeel heeft opgehoopt, met Iodium kleuren, neemt het blad een egaalzwarte kleur aan, maar vertoonen zich vooral de grootere nerven als wit op een donker veld. Wanneer wij microscopisch onderzoeken, blijken ook de

leukoplasten in de schorscellen zetmeel te bevatten, maar hun aantal is zoo gering, dat wij dit met het bloote oog niet constateeren. De zetmeelscheede is echter met zetmeel volgepropt, maar bij de grootere nerven is deze cellenrij met een zoo dikke laag van chlorophylarme cellen omgeven, dat dit zetmeel uitwendig veelal niet waarneembaar is.

Laten wij nu door overplaatsen in 't donker bij een gunstige temperatuur, het zetmeelgehalte afnemen, dan wordt met de Iodiumproef de zwartkleuring minder egaal, het blad neemt een „getijgerd uiterlijk” aan. Het langst nemen wij het zetmeel waar in de sluitcellen der huidmondjes, voorts in de zetmeelscheede, waardoor de uiteinden der nerven, die nog door geen of weinig schorscellen omgeven zijn, ook uiterlijk lang zwart blijven. In die genoemde schorscellen blijken de weinige leukoplasten echter ook lang hun zetmeel te behouden. In het overige parenchymatische spons- en palissadenweefsel blijft het langst het zetmeel direct langs de hoofdnerven aanwezig.

Het is zeer moeilijk dit verschillende zetmeelverlies te verklaren, omdat zeer vele mogelijkheden ervoor in aanmerking komen. Een langdurig voorkomen van zetmeel in een bepaald weefsel, zooals in de schorscellen, zou b.v. kunnen liggen aan sterkere assimilatie, of in het algemeen aan het voorkomen van grootere hoeveelheden suiker erin. Zoo zagen SACHS en PFEFFER de zetmeelscheede als transportbaan aan. Zij noemen deze cellenlaag daarom „Stärkebahn”, „Stärkestrasze” en 't is volgens PFEFFER „eine Folge relativ überwiegender osmotischer Anziehungskraft, welche der Stärkescheide ermöglicht fast alles an sich zu reissen.” Ook SCHIMPER zag in Hydrocharisbladen, welke met den steel naar boven in een 3 procentige suikeroplossing stonden, zonder dat het blad verwond was, het eerste zetmeel optreden in de schorscellenreeks, welke SCHIMPER Geleitzellen of Leitscheide noemt. Hieruit meent ook hij te mogen concludeeren, dat het deze cellen zijn, die de suikers tot zich trekken en de rol van transportbaan vervullen. Van hoe relatieve waarde deze beschouwingen zijn, volgt uit de overweging, dat evengoed de mogelijkheid bestaat, dat bij de leukoplasten in deze lang zetmeel bevattende cellen de synthetiseerende kracht grooter is, dan van leukoplasten in andere cellen, dat m.a.w. een lagere suiker-concentratie reeds voldoende is om zetmeel af te zetten. Het is een bekend feit, dat b.v. bij verschillende planten die suikerdrempel zeer afwijkt. In Hyacinthenbladen ontstaat zelfs onder de gunstigste assimilatie-voorwaarden in het parenchym geen zetmeel, zooals dit bij Tabak b.v. zeer rijkelijk het geval is. Brengen

wij Hyacinthenbladen in vrij sterke suikeroplossingen, dan vormt zich echter wel weer zetmeel. Zou nu ook tusschen de leukoplasten der verschillende cellengroepen in één plant de synthetiseerende kracht verschillend wezen en dus bij de schorscellen en zetmeelscheede grooter, dan kan men deze cellen moeilijk als ideaal voor het transport van suikers aanzien, omdat ze dan de geringste suikerhoeveelheden, direct in onoplosbaren vorm vastleggen.

Nu toonde HEINE (30) reeds in 1885, dat doorsnijden van de zetmeelscheede bij jonge kiemplanten geen beletsel voor groei was, terwijl het nieuw gevormde weefsel even zoo goed zetmeel bevatte. Verder werden kiemplanten van *Vicia* zoolang in het donker gezet tot ze vrij van zetmeel waren, waarop een deel van den stengel met stanniol omwikkeld werd en de belichting aanving. Na verloop van tijd was overal zetmeel, behalve in het bedekte stengeldeel. Dat het transport dus juist door de zetmeelscheede gaat, wordt hierdoor al zeer onwaarschijnlijk gemaakt.

Eerder moeten wij dan ook aannemen, dat in de schorscellen en in de zetmeelscheede de synthetiseerende kracht der leukoplasten grooter is dan in de gewone parenchymcellen. De proef van HEINE blijkt ook voor den Tabaksstengel geldig voor kortere belichtingen (enkele uren), daarna vormt zich eenig zetmeel, maar van een belangrijk transport of een sterke aantrekkingskracht is dan toch geen sprake. Steeds vormen deze schorscellen ook bij de Tabak, zoowel bij assimilatie, als uit suikeroplossingen eerder zetmeel dan de omliggende parenchymcellen. Wanneer wij de Tabaksplanten eenige dagen in donker laten staan, zoodat ook deze schorsparenchymcellen hun zetmeel verloren hebben, dan geeft een daaropvolgende belichting het resultaat, dat eerder zetmeel optreedt in de schorscellen dan in het overige parenchym. Er staan ons drie mogelijkheden open om dit te verklaren: 1. de schorscellen trekken de suikers uit het omliggende weefsel snel tot zich; 2. de suikerconcentratie in de schorscellen was nog grooter dan in het overige weefsel; 3. de synthetiseerende kracht van de leukoplasten der schorscellen is grooter dan die der leukoplasten in het palissadenparenchym. Ook kunnen deze mogelijkheden gecombineerd het verschijnsel veroorzaken.

Wat de eerste mogelijkheid aangaat valt eenvoudig te bewijzen, dat van een snelle suikerverplaatsing naar het schorscellenweefsel geen sprake is. Zelfs wanneer wij eenige uren een blad belichten met 24000 M.K., maar daarbij een deel van het schorscellenweefsel met stanniol bedekken, is geen zetmeelvorming in deze cellen die direct aan het assimileerende weefsel grenzen, waar te nemen. Het is dus

zeker, dat wanneer wij na slechts 5 minuten directe belichting met 24000 M.K. zetmeel in de schorscellen aantreffen, dit niet uit het omliggende parenchymatische weefsel is toegestroomd.

Ook het tweede punt komt voor de verklaring niet in aanmerking. Zooals uit de suikerbepalingen bleek, bevat op het moment voor de belichting noch het schorscellenweefsel, noch de rest van het blad eenige belangrijke hoeveelheid suiker, zóó dat deze kwantiteit voor nerven en rest van het blad geen verschil vertoont.

Het wordt dus zeer waarschijnlijk, dat de oorzaak der gemakkelijke zetmeelvorming in het schorscellenweefsel (evenals het moeilijke verdwijnen van het zetmeel er uit) gezocht moet worden in een grootere synthetiseerende kracht der leukoplasten. Of men zou moeten aannemen, dat de assimilatie in de schorscellen sterker was dan in de palissadenparenchymcellen, maar dan bestond er geen verklaring voor het feit, waarom uit geringe suikeroplossingen de schorscellen niet alleen eerder, maar ook bij lagere concentraties, dan 't overige weefsel reeds zetmeel kunnen vormen.

In het Tabaksblad hebben de leukoplasten in de verschillende weefsels dus een ongelijke synthetiseerende kracht. Wij moeten ons daarbij voorstellen, dat naast elkaar plaats grijpen Synthese en Hydrolyse van het zetmeel. Beide reacties bestaan waarschijnlijk uit verschillende schakels. Bij de werking van diastase onafhankelijk van de opbouwfunctie (buiten de plant) treden achtereenvolgens dextrine, maltose en glucose op. Eenvoudigheidshalve zal ik echter voorloopig spreken van twee processen naast elkaar; de Hydrolyse en de Synthese van het zetmeel uit suikers, welke waarschijnlijk beide door enzymen worden beheerscht. Het hangt nu van de verhouding dezer enzymhoeveelheden in de leukoplast af, hoe het evenwicht suiker \rightleftharpoons zetmeel in de plant wordt beheerscht. In de z.g. „suiker-planten” is dit evenwicht geheel in de richting van „suiker” verschoven, bij de aardappelknol en zooals we zullen zien ook in het Tabaksblad in de richting van zetmeelafzetting. Maar ook in het blad van één plant is de synthetiseerende kracht van alle leukoplasten niet gelijk. En is die der huidmondjes en der schorsparenchymcellen, zoo ook die der z.g. zetmeelscheede grooter dan die van het palissaden- of sponsparenchym. Zooals we zullen zien, zijn de leukoplasten der aan de nerven grenzende deelen van het parenchymatische assimileerende weefsel, wat hun synthetiseerende kracht aangaat, evenmin gelijk aan die van de rest van het parenchymatische weefsel. De synthetiseerende kracht der eersten is kleiner dan van de schorscellen, maar grooter dan van het verder van de nerven afgelegen parenchymatische weefsel.

Met deze feiten is ons thans de verdeeling van het zetmeel in het Tabaksblad begrijpelijk geworden. Een blad, dat flink geassimileerd heeft, bevat een gelijkmatige zwart-kleuring met de Iodiumproef, waarbij alleen de grootere nerven lichter zijn dan de omgeving, vanwege het zeer kleine aantal leukoplasten in deze cellen.

Eerst verdwijnt nu het zetmeel uit het palissaden- en schorsparenchym zoo ver mogelijk van de hoofdnerf (dus de bladranden) verwijderd. Op dit moment is het aan de nerven grenzende parenchym nog zwart, evenals de uiteinden der kleinere nerven. De laatsten hebben dit te danken aan de zetmeelscheede welke hier niet zoo als bij de dikkere nerven door een groot aantal schorscellen overdekt wordt en die zodoende niet uiterlijk het effect veranderen. Bij een dwarse doorsnede ziet men echter, dat tot in de grootste nerven en tot in den stengel de zetmeelscheede blijft gekarakteriseerd door een zeer constant en hoog zetmeelgehalte. Deze cellenreeks en de huidmondjes behouden het langst hun zetmeel, maar ook de schorsparenchymcellen, welke door hun gering aantal leukoplasten uiterlijk geen opvallende zetmeelvormende eigenschappen bezitten, houden in die weinige leukoplasten het zetmeel langer vast dan b.v. in het palissadenparenchym.

Het bleek, dat de leukoplasten uit de zetmeelscheede, maar ook die uit de overige schorsparenchymcellen een grootere synthetiseerende kracht hebben dan de leukoplasten in het assimilatieweefsel, m.a.w. dat zij reeds eerder dan deze het zetmeel uit geringe suiker-concentraties vastleggen. Waar bovendien bleek, dat van een sterke aantrekkende kracht voor suikers door deze cellen geen sprake was, komen wij tot de conclusie, dat zij in het Tabaksblad uiterst ongeschikt zijn voor vervoer van koolhydraten. Vooral ook omdat zij reeds kleine hoeveelheden suiker vastleggen, als deze op de een of andere wijze in deze cellen binnen dringen.

IV. EENIGE PROEVEN OVER DEN INVLOED DER VOOR- BEHANDELING OP DE OMZETTINGEN DER KOOL- HYDRATEN IN HET TABAKSBLAD.

Vóór alles was het noodig uit te maken in hoeverre de voorbehandeling der Tabaksplanten op de omzetting van het zetmeel van invloed was.

Daartoe werd nagegaan in hoeverre verschillen tusschen de onderste Zandbladen, de middelste bladen en de Topbladen aan een in de kas opgekweekte bloeiende Tabaksplant in dit opzicht bestonden.

Te dien einde werden eenige bladen van de 3 verschillende bladsoorten, welke in de kas een zoo gelijkmatig mogelijke vrije belichting hadden ontvangen, gemerkt, en na een zonnigen dag werden deze planten overgebracht naar een donkere kamer met een temperatuur van 9° C.

Met de Iodiumproef was bij het begin geen verschil in intensiteit der zwartkleuring waar te nemen. Na 2 dagen was er reeds een duidelijk verschil. Geven wij telkens het blad, waarin de zetmeelomzetting blijkens de Iodiumproef het verst was voortgeschreden met 1 aan, die waar deze het minst ver was voortgeschreden met 3 en die er tusschen in met 2, dan was na verschillende tijden verblijf bij 9° C. in donker de stand aldus:

Na:	Topbladen (4 ex.)	Middenblad. (4 ex.)	Zandbladen (4 ex.)
Voor de proef 's midd. 4 uur:	1	1	1
Na 45 uur bij 9° C. in donker:	1	2	3
Na 70 uur als vorig:	1	2	3
Na 95 uur als vorig:	1	2	3

Na 95 uur was het Topblad zijn zetmeel uiterlijk volkomen kwijt,

het Middenblad bevatte nog zetmeel en het Zandblad gaf met Iodium de sterkste zwartkleuring.

Deze proef bewees, dat de voorwaarden, die het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker beheerschen, in bladen van verschillende leeftijd ook bij uiterlijk dezelfde omstandigheden, ongelijk zijn.

Bij overplaatsen van dergelijke bloeiende Tabaksplanten bij temperaturen van 17° en 28° C. was het resultaat in zooverre volledig gelijk aan dat bij 9° C., dat ook hier de Topbladen sneller hun zetmeel verloren dan de Middenbladen en deze wederom sneller dan de Zandbladen.

Ook bij de bepaling van de hoeveelheid suikers in de verschillende bladtypes aanwezig, demonstreerde zich het ongelijke materiaal, dat de Zand-, Midden- en Topbladen ons leveren en die het noodzakelijk maakt met ander, meer uniform, bladmateriaal te experimenteren.

's Middags 5 uur bevatten deze verschillende bladtypes aan suikers per 10 Gram verschgewicht (hetgeen bij deze bladen met omstreeks 1 Gram drooggewicht overeenkwam):

	Totale hoeveelheid suikers berekend als glucose	Hiervan saccharose
Zandblad	8 mGr.	3 mGr.
Middenblad	16 mGr.	10 mGr.
Topblad	25 mGr.	22 mGr.

Niet alleen was op het oogenblik waarop de bladen geplukt werden de kwantiteit suikers zeer verschillend, maar de jongere hoogerop geplaatste bladen bevatten mede een steeds sterker percentage van deze suikers in den vorm van saccharose.

Zooals bij de Inleiding werd opgemerkt, werd er hierna toe overgegaan om het onderzoek te verrichten met zeer jonge Tabaksplanten, waarvan de eerste bladen zich zeer gelijkmatig ten opzichte van de koolhydraatzetzingen gedragen.

Het bleek echter noodzakelijk deze planten een gelijke voorbehandeling te laten ondergaan. Een eerste verschijnsel, waarop we later uitgebreider terugkomen demonstreerde zich in het feit, dat planten, die eenige dagen droog hadden gestaan, zich tegenover de zetmeelvorming, zoowel uit door assimilatie als op kunstmatige wijze toegevoerde suikers, geheel verschillend gedroegen, verge-

leken met planten, die onder dezelfde omstandigheden vochtig waren opgekweekt.

Verder oordeelde ik van theoretisch standpunt, dat wanneer men een blad in het donker tot volledig zetmeelverlies brengt, maar men hierna deze plant nog eenigen tijd langer in het donker laat, bij daarop volgende assimilatie de zetmeelvorming mogelijk anders kon wezen, dan bij een plant, die direct na het zetmeel kwijt te zijn, aan belichting werd blootgesteld.

Het was gebleken, dat de jonge Tabaksplanten na een zonnigen Maart- of Septemberdag, zooveel zetmeel hadden gevormd, dat er juist 18 uur verblijf in het donker bij 28° C. noodig was, om dit weer te doen verdwijnen. Op dit moment werd een belichting met 24000 MK. aangevangen (temp. 28° C.) en het verloop der zetmeelvorming met de Iodiumproef na verschillende belichtingstijden nagegaan. Hetzelfde gebeurde met dergelijke planten die langer tijd in 't donker hadden gestaan. Om een beeld te geven van het verloop der zetmeelvorming, werd bepaald na hoeveel tijd een zekere kleuring werd verkregen. Als Stadium I der zetmeelkleuring werd aangenomen het moment waarop in het palissadenparenchym microscopisch de eerste zetmeelkorrels konden worden waargenomen; twee andere zwarheidstypen werden als Stadium II en III genomen. Het resultaat was nu als volgt:

	Tijd waarna Stadium I bereikt werd	Idem Stadium II	Idem Stadium III
Na 18 uur verblijf in het donker bij 28° C. (juist vrij van zetmeel)	5 min.	10 min.	15 min.
Na 42 uur	10 min.	22.5 min.	30 min.
Na 90 uur	17.5 min.	30 min.	45 min.

Uit het resultaat volgt direct, dat wanneer het blad langer donker wordt gehouden de vorming van zetmeel wordt bemoeilijkt. Maar tevens blijkt bij een nadere beschouwing, dat niet de teruggelopen suikerconcentratie de eenvoudige verklaring voor deze vertraagde zetmeelvorming kan wezen. Was werkelijk alleen de door het lange donker houden gedaalde suikerconcentratie in te halen, alvorens de zetmeelvorming een aanvang kon nemen, dan zou van dat moment af voor de drie verschillend behandelde bladen de benodigde tijd om van stadium I het stadium II te

bereiken, gelijk moeten wezen. Dit is nu niet het geval; A heeft daartoe slechts 5 min., B 12.5 min. en C eveneens 12.5 min. noodig; om van stadium I op III te komen heeft A slechts 10 min., B 20 min. en C 27.5 min. noodig. De zetmeelvorming blijft dus vertraagd voortschrijden, zoodat zelfs na 11 uur nog een zeer groot verschil tusschen de verschillende bladen te zien is: het type A geeft een pikzwarte kleur, terwijl C slechts licht grijs van kleur is.

Een andere verklaringsmogelijkheid was, dat het donker houden invloed had gehad op de enzymverhoudingen, welke het evenwicht: suiker \rightleftharpoons zetmeel beheerschen.

BROWN en MORRIS (10) vonden, dat de diastatische werkzaamheid van bij 40° tot 50° C. gedroogde fijn gewreven *Helianthus*bladen grooter werd naar gelang de bladen langer in het donker waren gehouden. Nu zeggen dergelijke uitkomsten nog betrekkelijk weinig, omdat zooals later nog uitgebreider zal worden besproken de diastatische werking van bladpoeder en de zetmeelomzetting in overeenkomstige bladen dikwijls heelemaal niet met elkaar evenwijdig loopen. Het eenige middel, om een eventueele verschuiving van het evenwicht: suiker-zetmeel te constateeren, bestaat in de bepaling van de zetmeelvorming uit bepaalde suikeroplossingen bij bepaalde temperaturen. Vergelijken wij bladen, die 18 uur en die, welke eenige dagen in overeenkomstige suikeroplossingen bij 28° C. hebben gestaan, dan zien we de zetmeelvorming in beide gevallen gelijkmatig plaats hebben. Dezelfde concentraties vormen op dezelfde wijze en met dezelfde snelheid zetmeel, hetgeen ook WINKLER (101) reeds opgemerkt had. Men kan dus deze verminderde zetmeelvorming niet tot een verschuiving van de enzymverhoudingen terugvoeren.

Het bleek echter o.a. uit de geringere gewichtsvermeerdering, dat de assimilatie door het plaatsen in het donker vertraagd was. Uit de sluiting der huidmondjes, die microscopisch aan te toonen is bij eenige dagen in 't donker staan, volgt dat het wellicht de verminderde toevoer van CO₂ is, die de assimilatie en daardoor tegelijk de zetmeelvorming drukt. Dat de huidmondjes van vele planten zich onder invloed van donker sluiten, is een meer waargenomen verschijnsel.

Wat ook de oorzaak der verminderde zetmeelvorming moge wezen, in ieder geval bestaan er tusschen bladen, die ongelijken tijd in het donker hebben gestaan, verschillen. Het was daarom wenschelijk te werken met bladen, die een gelijken tijd in het donker waren geweest. Ik koos daartoe den tijd, noodig om de bladen juist in hun spons- en palissadenparenchym vrij van zetmeel te krijgen, dus na 18

uur in het donker bij 28° C. Daarna kwamen de bladen in de suikeroplossingen bij diverse temperaturen, of werden de verschillende assimilatie-proeven begonnen, welke een deel van dit onderzoek uitmaken.

Tenslotte namen BROWN en MORRIS nog het eigenaardige verschijnsel waar, dat hun Helianthusbladen los van de plant minder zetmeel vormden, dan aan de plant. Ook bij Tabak bleek dit verschijnsel met groote duidelijkheid naar voren te komen. Zooals we zullen zien, moeten wij deze verminderde zetmeelvorming toeschrijven aan een gering slap worden der afgeplukte bladen, die niet in staat zijn het water even snel als de bladen aan de plant weer aan te vullen.

Deze voorloopige proeven toonden in ieder geval overduidelijk, dat het zetmeelvormend vermogen voor diverse omstandigheden gevoelig is en dat dus een gelijkmatige voorbehandeling een eerste vereischte is voor een nadere bestudeering van het evenwicht zetmeel \rightleftharpoons suiker. Wanneer wij dan ook zien, dat SACHS werkende onder de buitengewoon variabele omstandigheden van het gematigde klimaat, uit het zetmeelgehalte bij verschillende temperaturen conclusies meende te kunnen trekken, over den afvoer van de koolhydraten bij verschillende temperaturen, dan kunnen wij herhalen, wat Miss MATTHAEI (47) voor dergelijke proeven van KREUSLER over den invloed van de temperatuur op de assimilatie zegt: „His results are not in the least the expression as he conceived them to be, merely of the effect of the temperature, but are the outcome of the most various causes, so complicated, that it is impossible to extricate from them the simple temperature-effect”.

V. PROEVEN OVER DE VORMING VAN ZETMEEL BIJ 28° C. DOOR ASSIMILATIE.

Wanneer men een Tabaksblad in het proefstadium¹⁾ gaat belichten met 24000 MK. in een omgeving waarin de temperatuur 22° C. is, maar waarbij de temperatuur in den lichtbundel 27—29° C. bereikt, dan ziet men, zooals reeds eerder beschreven, na 5 min. de eerste zetmeelkorrels optreden in de belichte leukoplasten der gewone palissadenparenchymcellen. Assimilatie gedurende slechts 5 min. verhoogt dus het suikergehalte dusdanig, dat de zetmeelvorming een aanvang neemt.

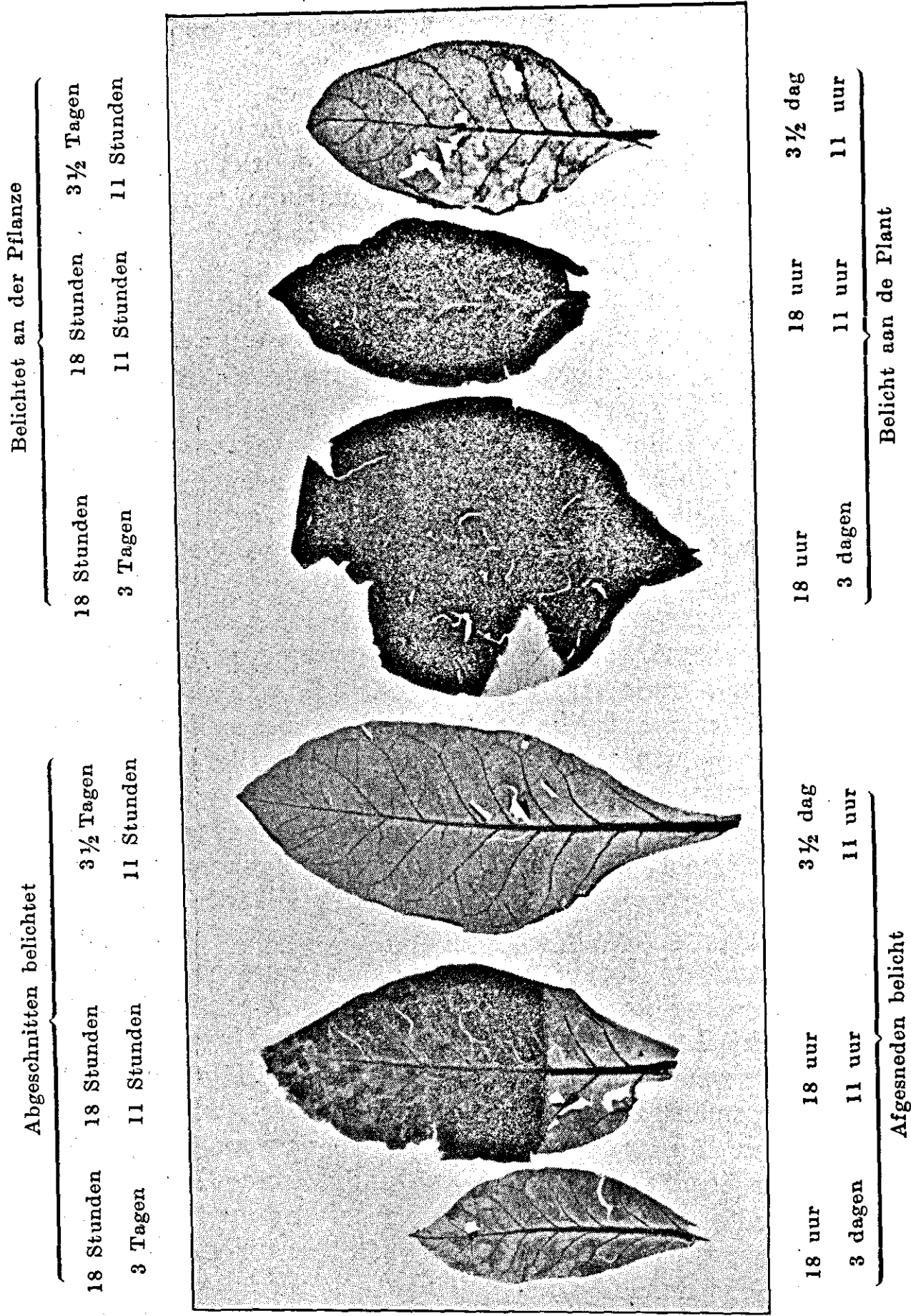
Om een idee te krijgen van de suikervorming in de cellen gedurende 5 min. assimilatie, willen wij een globale berekening uitvoeren. BROWN en MORRIS (10) en GILTAY (28) bepaalden de drooggewichtsvermeerdering voor verschillende planten in Europa en Indië. De vermeerdering van drooggewicht loopt in het algemeen onder gelijke omstandigheden voor de verschillende planten per M² bladoppervlakte niet zeer veel uiteen, zoodat deze per gelijk bladoppervlak wordt uitgedrukt. In de resultaten van GILTAY vinden wij zoo voor *Nicotiana rustica* (*Nicotiana tabacum* werd niet onderzocht) bij een temperatuur van zoowat 32° C. en „fortwährend Sonne” midden overdag bij directe bestraling in Indië 0.84 Gr. CO₂ per uur per M² bladoppervlakte vastgelegd. Een andere hierop veel gelijkende proef leverde 0.94 Gr. CO₂ per M² opgenomen. Wordt alles in den vorm van glucose omgezet, dan komt 0.84 Gr. CO₂ overeen met $180/264 \times 0.84$ Gr. glucose = ± 0.6 Gr. glucose en de tweede proefuitkomst (0.94 Gr. CO₂) met ± 0.7 Gr. glucose. Daar de temperatuur bij ons zoowat 28° C. bedroeg, zou onder overigens gelijke omstandigheden wat minder, ongeveer $\frac{1}{2}$ Gr. glucose per M² bladopp. per uur zijn gevormd bij directe bezonning.

¹⁾ Bladen, welke 's morgens 10 uur bij 28° C. in donker juist hun zetmeel kwijt zijn, betitel ik voortaan als bladen in 't proefstadium.

Direct zonlicht is ± 60000 MK. sterk, onze belichting 24000 MK., m.a.w. door de geringere belichting zou ook maar $\pm 2/5 \times 0.5$ Gr. = 0.2 Gr. per uur per M^2 zijn geassimileerd als glucose. (Deze evenredigheid is onder deze omstandigheden geoorloofd, zie MATTHAEI). Nu wogen 20 bladhelften der Tabaksplanten, wanneer ze voor het onderzoek werden gebruikt (zonder hoofdnerf) versch ongeveer 2.5 Gram, terwijl de bladoppervlakte ervan ± 150 cm^2 bedroeg. Het drooggewicht dezer jonge bladen was weinig groter dan 5 % van het verschgewicht. We kunnen dus zeggen, dat 5 Gram dezer verse bladen een oppervlakte hebben van 300 cm^2 en een drooggewicht van $1/4$ Gr. In 5 min. is dus de drooggewichtsvermeerdering bij onze belichting en temperatuur in 5 Gram verschgewicht ongeveer $0.03 \times 5/60 \times 0.2$ gram = $1/2$ mGr. Nemen wij voor globale becijfering aan, dat deze vermeerdering in drooggewicht suiker is en zich gelijkmatig over het watergehalte van het blad verdeelt, dan beteekent dit een concentratieverhoging van slechts ongeveer 0.01 %. Deze uitkomst is natuurlijk zeer globaal, maar geeft toch een idee van de uiterst geringe concentratievermeerdering, die in staat is om zetmeelvorming in de leukoplasten der palissadenparenchymcellen te bewerken. De leukoplasten der schorscellen, die na nog korter tijd beginnen met zetmeel te vormen, zijn bij een geringere concentratieverhoging daartoe in staat.

Wanneer de belichting voortduurt, ziet men met de Iodiumproef de hoeveelheid zetmeel voortdurend toenemen. Wanneer men alle voorzorgsmaatregelen tegen uitdrogen van het belichte blad neemt, gaat deze zetmeelvorming gestadig voort. Zelfs na 3 dagen is het zetmeelgehalte met de Iodiumproef duidelijk groter dan na 2 dagen. Een teruggang kon zelfs na langdurige belichtingen niet worden opgemerkt. Een „solarisatie” zooals volgens URSPRUNG (88) bij Phaseolus in de zon reeds na 4—5 uur en in „Bogenlicht” na 5—6 uur begon op te treden, kon door mij bij het Tabaksblad niet worden waargenomen. Anders was dit bij belichting van bladen los van de plant (zie fig. 2). Niet alleen, dat hierin overeenkomstig de resultaten van BROWN en MORRIS de zetmeelvorming langzamer voortschreed, deze ging bij langere belichtingen terug. Het was echter onmogelijk bij deze afgesneden bladen een gering slap worden te voorkomen. Reeds GILTAY (28) wees er op, dat afgesneden bladen hun waterbehoefte moeilijker aanvullen, dan die aan de plant. En zelfs wanneer ik deze bladen in een atmosfeer zeer rijk aan waterdamp bracht en de bladen tegen een vochtigen groven doek, die ook in water hing, aanlegde, was het niet mogelijk een uitdroging te voorkomen. Wanneer wij een dergelijk belicht blad, dat met Iodium

FIG. 2



Vorbehandlung: im Dunkeln
bei 28° C. während.....
Belichtet: bei 28° C. mit
24000 M.K. während.....

Vorbehandlung: Donker bij
28° C. gedurende.....
Belicht: bij 28° C. met 24000
M.K. gedurende

Op deze en alle andere foto's ziet men bladen, welke na onttrekking der groene kleurstoffen met alcohol, gekleurd zijn met Jodium.

In dieser und in allen anderen Photographien sieht man die Blätter, nachdem sie der Jodprobe von Sachs unterworfen worden sind.

gekleurd is, nader bezien, merken wij direct, dat het meeste zetmeel gevormd is op de plaatsen die de sterkste watertoevoer ontvangen, dus op de plaats waar het blad in water steekt (zie fig. 2), en verder langs de hoofdnerf, terwijl steeds hoogerop naar den top van het blad toe de zetmeelkleuring afneemt, wat verband houdt met de sterkere uitdroging van dit bladeinde. Nog duidelijker is dit verschil na eenige dagen belichting. Bij mijn proeven — en waarschijnlijk ook bij die van BROWN en MORRIS — is de oorzaak der verminderde zetmeelvorming in afgesneden bladen in de (geringe) uitdroging te zoeken. Zeer onlangs heeft AHRNS (1) hetzelfde vermoeden uitgesproken voor de bedoelde waarneming van BROWN en MORRIS (10). Ik zal bij de verdere resultaten hierop terugkomen, omdat ook daaruit zal blijken hoe bijzonder gevoelig de zetmeelvorming voor uitdroging is.

Het is mogelijk, dat de z.g. „solarisatie” van URSPRUNG (88) ook niets anders is, dan een geringe uitdroging van het belichte blad, welke watervermindering bij grootere belichtingssterkten (en dus meer warmtetoevoer) en bij langduriger belichtingen steeds moeilijker is te ondervangen.

Wanneer wij nu zoo'n Tabaksblad aan een plant 3 dagen lang belichten, maar een deel b.v. tusschen hoofdnerf en bladrand met zwart papier donker houden, dan blijft dit bladdeel in het gewone parenchym vrij van zetmeel, alleen het schorsparenchym vertoont in enkele millimeters van het belichte gedeelte zwakke zetmeelvorming. Dit eenvoudige feit acht ik van beteekenis. Immers terwijl een uiterst geringe suikervermeerdering (5 min. assimilatie bij 28° C. in 24000 MK.) in staat is zetmeelvorming te bewerken, zijn de assimilaten, die bij ongeveer 850 maal zoo lange belichting worden gevormd niet in staat, om in het aangrenzende niet-belichte parenchym zetmeelvorming te veroorzaken. Omdat in 't donker uit suikeroplossingen zetmeel gemaakt kan worden, is de verklaring niet, dat zetmeelvorming in 't donker onmogelijk is. Wij moeten dus aannemen, dat de suikers niet uit de aangrenzende cellen (of in het algemeen praktisch niet van cel tot cel) diffundeeren. Ook het transport der assimilaten zal dus niet in eenigszins noemenswaardige mate in den vorm van suiker plaats vinden. We kunnen gerust van de geringe zetmeelvorming in de nerven, vlak bij het belichte oppervlak, afzien. Ik vond immers vroeger, dat de schorsparenchymcellen niet sterker de suikers tot zich trekken, doch bij nog geringere concentratievermeerdering tot zetmeelvorming in staat zijn. Er is dus na 3 dagen zoo weinig gediffundeerd tot op eenige millimeters afstand van het assimileerende gedeelte, dat het parenchym

niets, maar het schorsparenchym juist iets heeft kunnen vormen. Doch reeds eenige millimeters van de assimileerende cellen af treffen we heelemaal geen zetmeel meer aan, is dus de suikerconcentratie nog geen 0.01 % verhoogd. Dit bewijst overduidelijk, *dat in deze drie dagen ondanks de sterke assimilatie geen transport in den vorm van suikers heeft plaats gevonden.*

We willen nu de chemische analyse van het bladmateriaal voor en na assimilatie in verband hiermede nader bezien. Steeds werd de hoofdnerf verwijderd en het overige bladdeel onderzocht.

In het proefstadium (na 18 uur donker bij 28° C.) was het drooggewicht niet meer dan 5.3 % van het verschgewicht. Zetmeel kwam in het blad niet meer voor en de totale hoeveelheid suikers, bedroeg 2 mGr. per 10 Gram versch drooggewicht. Dit was bij de vele bepalingen, die hierover gedaan werden, steeds het geval. De totale hoeveelheid suiker was in dit stadium nooit meer dan 2 tot 3 mGr. per 10 Gram verschgewicht.

Na een 11-urige belichting was het drooggewicht gestegen tot 7.4 % van het verschgewicht. De zetmeelvorming uitte zich in een hoeveelheid van 140 mGr. per Gram drooggewicht. Het suikergehalte bedroeg 5 mGr. per 10 Gram verschgewicht, waarvan 1 mGr. monosen, 1 mGr. saccharose en 3 mGr. maltose.

Eerst bedroeg 't drooggewicht per 10 Gram verschgewicht:

	530 mGr.
na assimilatie	740 mGr.
Toename	210 mGr.

Het zetmeelgehalte was eerst nihil, na assimilatie per 10 Gr. versch gewicht

103 mGr.

De toename der suikers..... 2 mGr.

Totale toename der koolhydra-

ten ¹⁾ 105 mGr.

Deze uitkomsten toonen ons meerdere eigenaardigheden. Ten eerste: de toename der suikers is uiterst gering in het assimileerende blad. Dus: of het eerste assimilatieproduct is geen suiker, of het wordt onmiddellijk verder omgezet. Zooals we later zullen zien, is het laatste hoogstwaarschijnlijk het geval.

Berekend als concentratie van het bladsap stijgt het totale suikergehalte van 0.02 % tot ongeveer 0.05 %. Deze uitkomst sluit zich aan bij mijn vroegere resultaat: dat de zetmeelvorming door een

¹⁾ Alles uitgedrukt in glucose.

suikervermeerdering in de eenheid van $\frac{1}{10}$ per mille gevoelig is, d.w.z. dat dan de zetmeelafzetting begint.

Het is echter zonder meer duidelijk, dat de suikers ook onmiddellijk tot vorming van andere verbindingen aanleiding hebben gegeven. Immers de helft der gewichtsvermeerdering zijn slechts koolhydraten.

Verder is het suikergehalte van een (bij 28° C.) sterk levend en assimileerend blad zoo gering, dat men moet afzien van het idee, dat suiker in het blad transportstof is. Van een transportstof mag men toch verwachten, dat zij in een sterk levend en groeiend blad in eenigszins belangrijke concentratie voorkomt. En nooit vond ik in een dergelijk levend Tabaksblad meer suikers dan we in de vorige uitkomsten constateerden. Alleen in bladen, waarin groei (hetzij door afsnijden, hetzij door lage temperaturen) was verhinderd, treedt suiker, zooals we zullen zien soms in grootere hoeveelheid op. Zoo wordt de op andere manier reeds verkregen uitkomst bevestigd, dat de koolhydraten tenminste in jonge Tabaksbladen niet in het transport op beteekende wijze worden betrokken. Zetmeel is daar geen transitorische reservestof, uit de verdeeling van zetmeel in een Tabaksblad op verschillende tijden, kan men geen conclusies trekken over het vervoer der assimilaten. In hoeverre deze uitkomsten voor het Tabaksblad ook voor andere bladen geldig zijn, heb ik niet nagegaan, maar in ieder geval zijn conclusies als van SCHIMPER twijfelachtig. Want wat andere bladen betreft, kan ik wijzen op het resultaat van HEINE bij *Vicia*, waarbij ook het zetmeel niet transitorisch ontstond. Verder wijs ik op het algemeene feit, dat men in vele, zoo niet in alle bladen, die zetmeel bij assimilatie vormen, de nuanceeringen van een fotografisch negatief omgekeerd kan ontwerpen bij belichting, zoodat ook hier tusschen de verschillende cellen weinig uitwisseling van suikers schijnt plaats te hebben.

VI. PROEVEN OVER DE VORMING VAN ZETMEEL BIJ 28° C. UIT SUIKEROPLOSSINGEN.

In 1883 toonde BOEHM (9) aan, dat Phaseolusbladen, drijvende op oplossingen van $\frac{1}{4}$ tot 20 % rietsuiker en druivensuiker in het donker zetmeel vormen.

WINKLER (101) vond in concentraties van 0.2 % tot 10 % toename ervan, van 10 % tot 20 % een gelijkblijven en van 30 % geen zetmeel meer gevormd. Hij spreekt van procenten suiker, waarmee hij waarschijnlijk rietsuiker bedoelt. Met de temperatuur houdt hij geen rekening.

ARTHUR MEYER (49, 50) ging voornamelijk het vermogen tot zetmeelvorming uit verschillende organische stoffen na, zooals saccharose, manniet, glucose, glycerine, enz. Het aantal organische stoffen, waaruit de plant zetmeel kan vormen is in het algemeen groot, maar niet voor alle planten hetzelfde, zoo kan volgens TRÉBOUX (87) Adonis vernalis uit adoniet zetmeel vormen, wat andere planten niet mogelijk is.

CZAPEK (15) en LIDFORSS (42) werkten over den invloed van lage temperaturen op de zetmeelvorming uit suikeroplossingen, waarop we terugkomen. De proeven van REINHARD UND SUSCHKOFF (68) over invloed van aether op het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker verdienen de aandacht niet, omdat, zooals ook LUNDEGÅRDH (46) opmerkt zulke enkele losse proeven, gezien de variabiliteit en de vele verklaringsmogelijkheden, niet het minste licht verspreiden.

Een systematisch onderzoek over invloed van suikerconcentraties, in verband met de temperatuur op de zetmeelvorming van één of eenige bladsoorten is nog niet gebeurd en wat de bladen uit de toegevoerde suikers maken, daarover weten wij kwantitatief niets.

Deze zetmeelvorming uit suikers werd reeds in 1893 door BROWN en MORRIS (10) als een der belangrijkste verschijnselen bij de koolhydraatomzettingen opgevat. En zij zeggen dan ook: „This is a

fact of immense importance for the study of the assimilative processes and is one we think far too little attention has been given by vegetable physiologists." Omdat sindsdien geen onderzoek in deze richting gedaan werd, kwam het mij interessant voor hierover een aantal proeven te verrichten.

Ik werkte daartoe met Tabaksbladen, bladen van *Tropaeolum*, *Phaseolus vulgaris*, *Sinapis alba* en *Prunus laurocerasus*. Bij de eerste werd behalve het resultaat, dat de Iodiumproef geeft, ook een kwantitatieve bepaling der koolhydraten uitgevoerd.

Bladen, die in het proefstadium juist zetmeelvrij waren, werden afgeknipt, in kleinere deelen gescheurd en soms werden nog eenige insnijdingen aangebracht om de suikers gemakkelijker binnen te doen dringen, daar reeds spoedig gebleken was, dat suikers door de opperhuid vrijwel niet heengaan. Deze bladstukken kwamen nu met de onderzijde drijvend op de suikeroplossing te liggen. De schaaltes en suikeroplossingen waren vooraf gesteriliseerd, terwijl de bladen van te voren afgespoeld waren. De schaaltes met de diverse suikeroplossingen kwamen eerst in de thermostaten, zolang totdat de verschillende temperaturen waarbij gewerkt werd (1½, 12°, 17° en 28° C.) door de oplossingen waren aangenomen.

De bladstukken werden na verloop van tijd (1, 2, 3 en meer dagen) in alcohol gefixeerd en de Jodiumproef van SACHS uitgevoerd. Soms was, vooral bij de hogere temperaturen, schimmelaantasting opgetreden. Dan werd de proef herhaald.

De resultaten verkregen met *Tropaeolum* en *Nicotiana* wil ik in 't kort vermelden. Voor de onderzochte concentraties bleek de zetmeelvorming na 1 dag verblijf bij 28° C. bijna even snel voort te schrijden als bij 17° C. in 2 dagen en bij 12° C. in 3 dagen. Het stadium van zetmeelkleuring, dat bij 2 dagen verblijf in de oplossingen bij 28° C. verkregen is (dus 4 dagen bij 17° C. en 6 dagen bij 12° C.) stelt het eindstadium voor, d.w.z. langer verblijf in de oplossingen verandert het resultaat maar weinig, er is een soort evenwicht ingetreden tusschen oplossingen en blad. In fig. 3 ziet men de verschillende snelheid van zetmeelvorming bij 28° C. en 12° C. weergegeven. In het algemeen werd nu na 2 dagen bij 28° C., 4 dagen bij 17° C., een week bij 12° C. en 4 weken bij 1.5° C. het materiaal gefixeerd, omdat op dat moment het eind-stadium geacht mocht worden bereikt te zijn.

De eindresultaten bereikt bij 12°, 17° en 28° C. bij concentraties van 1 tot 40 % saccharose en van 1 tot 24 % glucose stemmen overeen en kunnen dus tezamen besproken worden.

Een van de eerste dingen, die bij beschouwing der zetmeelvor-

ming in het blad opvallen, is het uitblijven van zetmeelvorming in 6 tot 10 rijen cellen, welke direct aan de sneevlakte grenzen, hetgeen ook in sommige der foto's nog duidelijk als een witte rand zichtbaar is. Dit verschijnsel werd bij alle door mij onderzochte bladen waargenomen.

De mogelijkheid bestond, dat onder invloed van den wondprikkel enzymen gevormd worden, die de zetmeelvorming voorkomen. Om dit na te gaan, werden bladen vol zetmeel eveneens gescheurd en het *verdwijnen* van zetmeel uit de bladen nagegaan. Het bleek nu, dat de aan de sneevlakte grenzende cellenlagen hun zetmeel op geen enkele manier kwijt raakten, en zelfs, dat het zetmeelgehalte erin evengroot bleef als dit vooraf bij het afplukken was. Afbrekende enzymen waren dus niet gevormd, integendeel moeten wij aannemen, dat de door knippen of snijden gekneusde cellen geen functie meer verrichtten, daar ze hierdoor onmiddellijk gedood waren, evenals dit b.v. door alcohol gebeurt. Het bleek, dat hoe ruwer te werk werd gegaan hoe breeder deze cellenreeks was, en dat overal door kneuzen, drukken, enz. de cellen in het blad kunnen worden gedood. Wanneer wij microscopisch het bladweefsel bekijken blijkt ook, dat de plasmatische inhoud samengeschrompeld, gecoaguleerd is. (Ook plasmolyseeren en deplasmolyseeren gaat dus niet meer).

Wij kunnen deze zone van gedooide cellen verder buiten beschouwing laten bij de zetmeelvorming. Door scheuren wordt het dooden der cellen zeer beperkt, omdat geen drukking uitgeoefend wordt.

Andere onderzoekers hebben meermalen op het eigenaardige van dit verschijnsel gewezen. Zoo vermeldde SCHROEDER EN HORN (81) het onlangs nog in hun meer genoemde publicatie en MOLISCH (54) zegt nog in 1921: „Die Erscheinung, dass das unmittelbar die Schnittwunde angrenzende Gewebe wegen seines Stärkegehaltes in einer Zone von $\frac{1}{4}$ — 2 mm. mit Jod tiefblau erscheint, habe ich bei vielen Blattarten gefunden”.

In verband hiermede zijn nog interessant eenige waarnemingen van MÜLLER—THURGAU (56) uit zijn onderzoek van tabaksmonsters uit verschillende streken op hun zetmeelgehalte met de Iodiumproef. Hij vermeldt: „Die Blätter der Sorte St. Felix Brazil (8.76 % Stärke) zeigten nach der Jodprobe einen ganz eigenthümlichen, durch eine besondere Vertheilung der darin vorhandenen Stärke verursachten Anblick, ganz als ob sie durch mehrere Lagen gekreuzter schwarzer Streifen und Linien schraffirt worden wären. Bei Betrachtung dieser Blätter gelangt man unwillkürlich zu der Anschauung, alsob dieselben vielleicht bei oder bald nach der Ernte mehreremal nach verschiedenen Richtungen zusammengeknittert

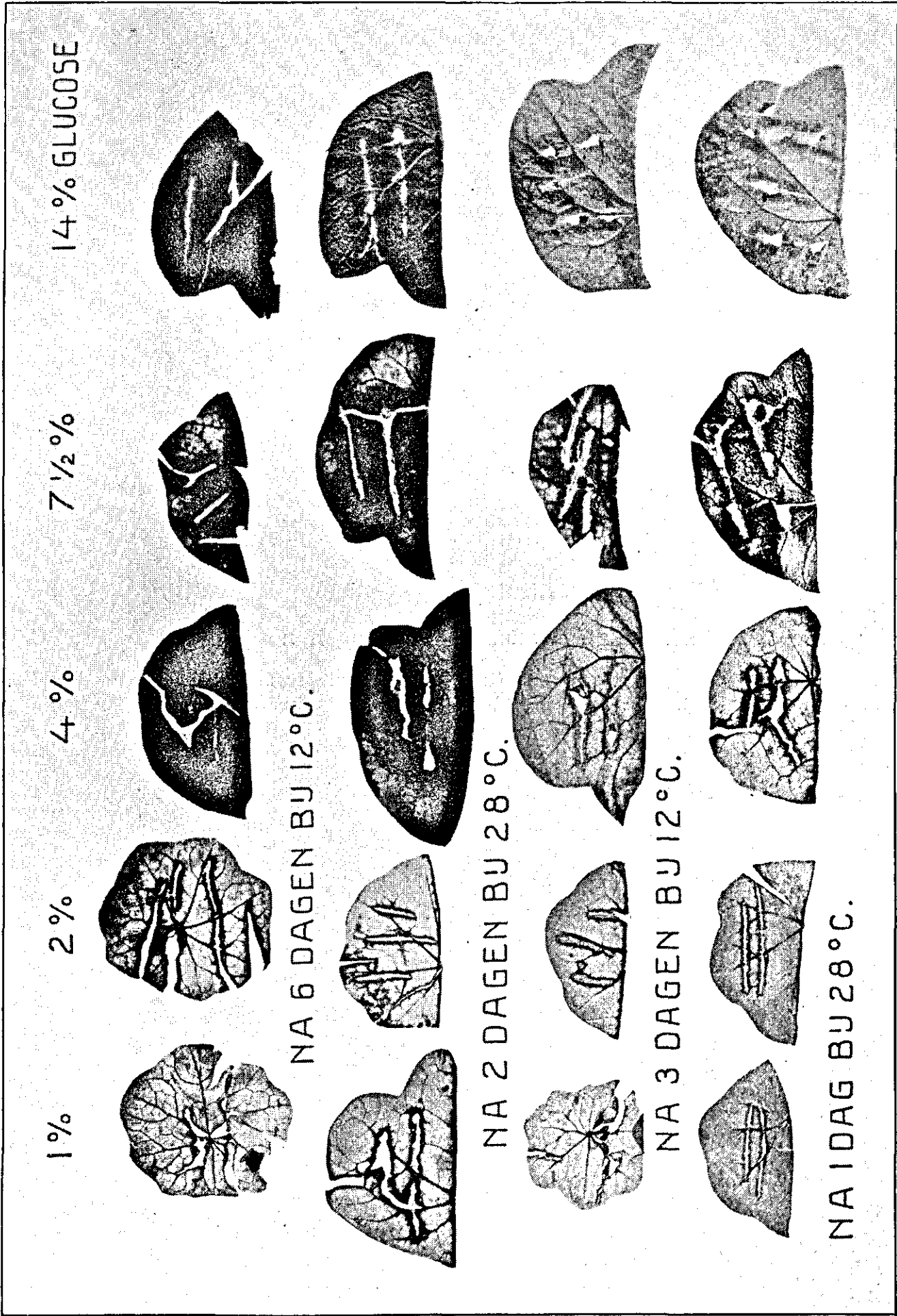


FIG. 3

Zetmeelvorming in Tropaeolum-bladen in donker bij 12° en 28° C. na verschillende dagen in concentraties van 1 tot 14 % glucose.

Stärkebildung aus Glukoselösungen im Dunkeln, bei 12° und 28° C. nach verschiedener Zeit.

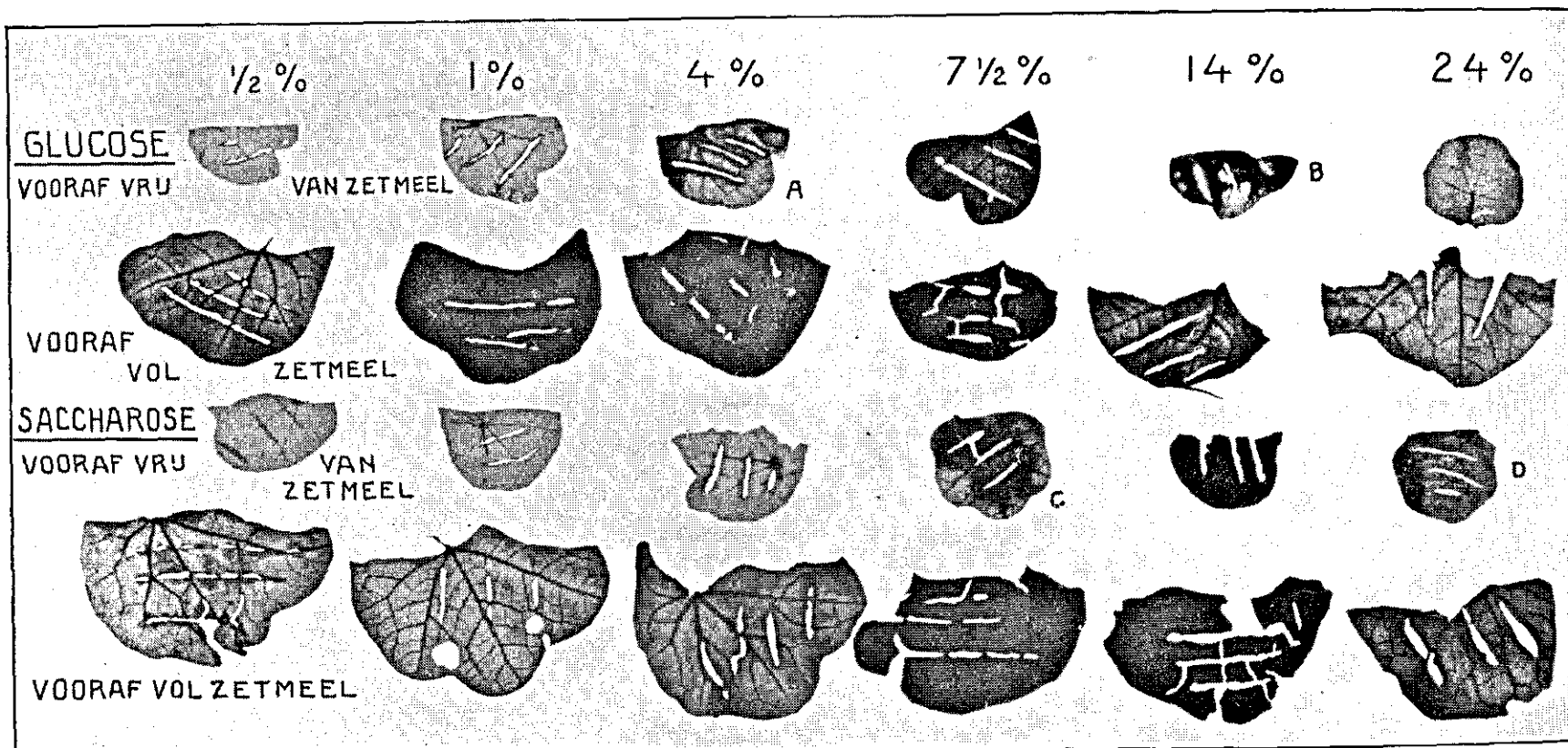


FIG. 4

Zetmeelvorming in Tropaeolum-bladen uit suikeroplossingen na 2 dagen bij 28° C.

Stärkebildung aus Zuckerlösungen nach 2 Tagen in 28° C. in Tropaeolumblättern, welche vor dem Versuche Stärkefrei und in solchen, welche vor dem Versuche Stärkereich waren.

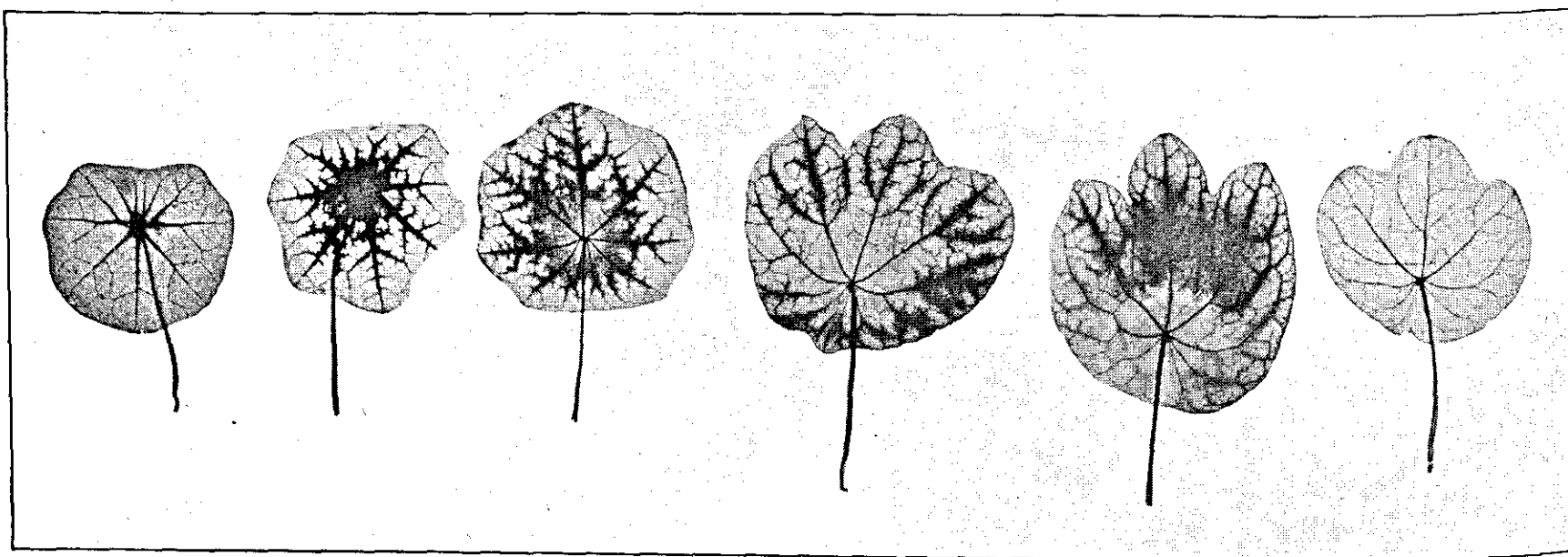


FIG. 5

Tropaeolum-bladen, die (van links naar rechts) korter of langer in geconcentreerde suikeroplossingen stonden. (Men ziet eerst het zetmeelgehalte toenemen, daarna vermindert dit echter weer.)

Tropaeolumblättern, welche während verschiedener Zeit bei 28° C. in einer konzentrierten Zuckerlösung standen. (Die linken Blätter am kürzesten, Zuerst nimmt der Stärkegehalt zu, später geht er zurück.)

worden wären". En: „Endlich möge noch Erwähnung finden, dass da wo ein Blatt infolge Krankheit, beziehungsweise durch Pilze beschädigt wurde, beim Trocknen leicht Stärke in den angrenzenden Zellpartien zurückbleibt."

Zonder twijfel zijn bovenstaande bladen vol zetmeel geplukt en heeft de beschadiging direct in bepaalde deelen (door kneuzing, enz.) het zetmeel voor goed onveranderlijk gefixeerd. In de rest van het blad verdwijnt bij de droging het zetmeel, maar in de gedooide cellen kan geen zetmeelomzetting meer plaats grijpen. Ik heb het verschijnsel bij gedroogde Amerongsche Tabak eveneens waargenomen, waarbij gevouwen of beschadigde deelen zetmeel bevatten langs deze wonden.

Het is zeker voor de kwaliteit van Tabak ook hierom reeds van belang, dat dergelijke beschadigingen bij den pluk zooveel mogelijk worden vermeden, omdat de omzettingen, waarom het bij de droging en fermentatie te doen is, in het beschadigde deel, dus in de gedooide cellen niet of in veel mindere mate plaats hebben, dan in de na den pluk levende en langzaam afstervende cellen van het blad.

Voor de eindresultaten van zetmeelvorming in de diverse suikerconcentraties, beschouwe men foto 4 en 6. Bij de lagere concentraties (1 en 4 % saccharose en glucose) is alleen het weefsel direct langs de sneden en nerven met zetmeel gevuld. Naar mate de concentraties hooger worden nemen ook de bladgedeelten verder van de nerven en sneden verwijderd een zwarte kleur aan bij behandeling met Iodium. Het maximum der zetmeelvorming wordt bereikt bij $7\frac{1}{2}$ % glucose en 14 % saccharose. Bij 14 % glucose en 24 % saccharose is de zetmeelvorming al minder sterk. Thans is het weefsel direct langs de sneden juist vrij van zetmeel en de verder van de sneden gelegen bladdeelen nog vol zetmeel. (Vergelijk in fig. 4: a met b; en c met d). Bij nog hoogere concentratie vormt het weefsel vrijwel nergens meer zetmeel (24 % glucose en 40 % saccharose). Nog slechts enkele nerven, zoover mogelijk van de sneevlakte af zijn zwart gekleurd. In dit opzicht stemde het resultaat bij alle bladen (Tabak, Tropaeolum, Prunus laurocerasus, Sinapis alba) overeen.

Wanneer ik nu bladen nam, die door assimilatie vol zetmeel waren en ik legde deze bladen in dergelijke verschillende concentraties, dan was het eindresultaat vrijwel gelijk als bij die, welke vooraf geen zetmeel bevatten. Bij de lagere concentraties konden de omgevende suikeroplossingen niet verhinderen, dat het zetmeel eruit verdween, behalve uit het weefsel direct langs nerven en snede. Bij de allerhoogste concentraties veroorzaakten deze een afname van het zetmeelgehalte. (Zie fig. 4).

Deze resultaten leidden mij tot de volgende overwegingen: Bij de concentraties van $\frac{1}{2}$ tot 4 % saccharose en glucose dringen de sui-

kers slechts heel weinig diep in het weefsel binnen, (we weten immers dat slechts een zeer geringe suikervermeerdering tot zetmeelvorming aanleiding geeft).

Hoewel het denkbaar was, dat het vormen van zetmeellangs de sneden aan een bevordering van het evenwicht: suiker \rightleftharpoons zetmeel in de richting van zetmeelopbouw, tengevolge van den wondprikkel, was te wijten, blijkt dit onjuist. Wanneer men namelijk de hypertonische concentraties nadert, blijft het zetmeel ook alweer het eerst weg in de buurt der sneden, en blijkt dus het verschillende gedrag van de cellen langs de sneden en die er verder vandaan, slechts beheerscht te worden door het indringen der suikers in deze weefsels en niet een gevolg te zijn van den wondprikkel.

Dat behalve langs de sneden ook $\frac{1}{2}$ het weefsel langs de nerven het eerst zetmeel vormt, wordt dááruit begrijpelijk, dat de tracheeën, die direct met de suikeroplossing commu-

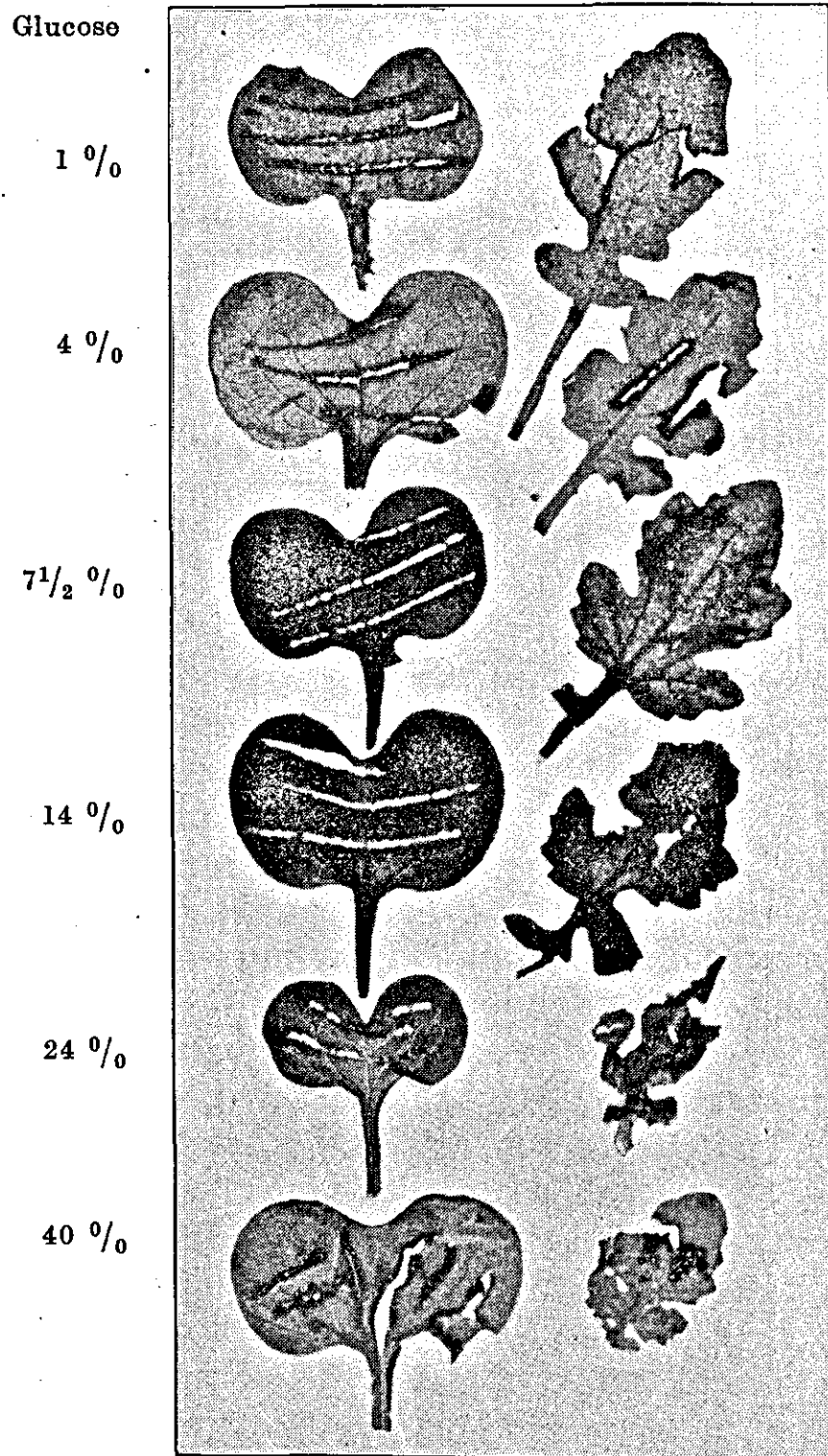


FIG. 6.

Zetmeelvorming in bladen van *Sinapis alba*-kiemplanten uit glucose-oplossingen na 2 dagen bij 28° C.

Stärkebildung in *Sinapis*blättern aus Glukoselösungen nach 2 Tagen bei 28° C.

een milieu vormen, van waaruit het binnendringen van de suiker plaats grijpt.

Bij het eigenaardige verschijnsel van den schadelijken invloed, die hoge concentraties op de zetmeelvorming uitoefenen, valt spoedig in 't oog, dat dit bij glucose bij half zoo geconcentreerde oplossingen optreedt, als bij saccharose. Bij een microscopisch onderzoek blijkt bovendien, dat de zetmeelvorming benadeeld wordt, zoodra plasmolyse optreedt. Het bewijs hiervoor werd toen bovendien nog geleverd door het samenstellen van een oplossing van 7½ % glucose (waarin de zetmeelvorming maximaal verloopt) met hieraan toegevoegd 4 % NaCl. Deze oplossing heeft ongeveer eenzelfde hypertonische werking als 24 % glucose. Onder deze omstandigheden trad geen zetmeel in het blad op. *De plasmolyse werkt dus de vorming van zetmeel tegen.*

Er was voorts microscopisch te zien, dat de schorsparenchymcellen, (waarin zooals wij reeds meer vonden, het evenwicht: suiker \rightleftharpoons zetmeel in de richting van zetmeelvorming begunstigd is boven het andere parenchymatische bladweefsel), ook het laatst onder invloed der hypertonische oplossingen hun zetmeel verliezen.

Zeer demonstratief komt het verschijnsel van de vorming van zetmeel ook uit in fig. 5. Tropaeolum-bladen zijn hierbij met de stelen in een 40 percentige saccharose-oplossing gezet bij 28° C. en tamelijk droge omstandigheden. De bladen verdampen en vullen het vloeistofverlies uit de oplossing aan. Hoe langer nu de bladen erin staan, hoe hoger de concentraties in het blad worden. Men ziet nu het zetmeel zich vanaf de nerven vormen; later gaat de zetmeelvorming van hieruit zooals te verwachten was terug, naar mate de suiker-concentratie door de verdere verdamping en aanvulling uit de oplossing vanuit de nerven grooter en grooter wordt. Microscopisch treedt het eerst en het verst het zetmeel op in de schorsparenchymcellen en handhaaft zich hierin bij toenemen der concentratie ook het langst.

Op dezelfde wijze geschiedt het binnendringen in Tabaksbladen.

Bovenstaande proeven werden aangevuld door voor Tabak en Tropaeolum bij 28° C. ook de zetmeelvorming bij nog lagere concentraties te onderzoeken. Voor beide bladen werden overeenstemmende uitkomsten verkregen, welke ik dus tezamen vermeld.

Deze proeven waren tijdroovend. Het is n.l. zeer lastig te beoordeelen, of zich nog minimale zetmeelhoeveelheden in de leukoplasten bevinden en juist bij de grensgevallen is het resultaat dikwijls twijfelachtig. Ook de variabiliteit doet zich hier als een zeer onaangename factor gelden. Intusschen bleek, dat de plasma-arme

langgestrekte schorsparenchymcellen reeds in geringere concentraties zetmeel vormden, dan de mesophylcellen, waarvan ik mij tot onderzoek van het palissadenweefsel bepaalde. De huidmondjes bleven door hun constant zetmeelgehalte buiten beschouwing. Bij de onderstaande proeven werden 3—4 bladstukken van ongeveer gelijke grootte in 20 cc. oplossing bij 28° C. geplaatst, en het resultaat na 3 dagen onderzocht.

Glucose. (De cellen door scheuren gedood werden als steeds genegeerd).

0.05 %. Zetmeel in betrekkelijk veel mesophylcellen langs de snede. In de schorsparenchymcellen nog tot een enkele mm. ver in het weefsel zetmeelkorreltjes in de leukoplasten.

0.025 %. Als voren, doch zwakker en slechts in de cellenrij vlak langs de snede zetmeelkorreltjes waarneembaar.

0.0125 %. Geen zetmeel in het palissadenparenchym. De schorsparenchymcellen in de nerven vlak langs de snede bevatten nog zetmeel.

0.00 % (water, controle). Geen spoor van zetmeel, behalve in enkele huidmondjes.

Saccharose.

0.05 %. In eenige cellen langs de sneden bevindt zich nog zetmeel in de leukoplasten. Schorsparenchym als bij glucose.

0.025 %. Weinig of geen zetmeel meer in de cellen van het gewone mesophyl. Schorsparenchym als bij glucose.

0.0125 %. Geen spoor van zetmeel meer in het weefsel, behalve in 't schorsparenchym vlak bij de snijvlakten.

Wij nemen waar, dat in *Tropaeolum* en *Nicotiana* bij 28° C. de palissadenparenchymcellen, direct grenzende aan de oplossing ¹⁾ nog uit omstreeks $\frac{1}{20}$ % glucose en saccharose zetmeel vormen. De grensconcentratie voor zetmeelvorming in de leukoplasten der gewone palissadencellen ligt bij ongeveer $\frac{1}{40}$ % der genoemde suikers in de direct omgevende oplossing. De leukoplasten uit de schorsparenchymcellen vormen zelfs bij nog geringere suikerconcentraties zetmeel. Dit komt zooals we vroeger zagen niet door een grootere aantrekkingskracht voor suiker, maar door een eerdere zetmeelvorming der leukoplasten uit lagere suikerconcentraties.

¹⁾ De gedooide cellen weder buiten rekening gelaten.

Deze grensconcentraties maken een vergelijking mogelijk met de concentraties in 't blad, waar bij 28° C. bij assimilatie de eerste zetmeelvorming optreedt. De suikerconcentratie van Tabaksblad vóór assimilatie bedroeg omstreeks 0.02 %. Assimilatie van 5 min. deed de concentratie naar berekening met ongeveer 0.01 % toenemen. Dan, dus bij ongeveer 0.03 %, begon de zetmeelvorming der leukoplasten van het pallisadenweefsel. Het schorsparenchym begon reeds bij lagere concentraties zetmeel af te zetten. We constateren, dat onze uitkomsten bij de zetmeelvorming uit suikerconcentraties in 't donker verkregen, zich volkomen aansluiten bij de assimilatie-uitkomsten, wat betreft de drempel-concentratie, waarbij zetmeelvorming mogelijk wordt (eenige tienden per mille suiker). Maar ook het feit, dat de schorsparenchymcellen reeds bij lagere concentraties daartoe in staat zijn, zoowel als 't resultaat, dat bij lagere concentraties de suikers zelfs na 3 dagen niet verder dan enkele cellenlagen ver het bladweefsel kunnen indringen, is met wat bij assimilatie waargenomen werd, in overeenstemming. Tot bij 1 en 4 % dringt suiker nog uiterst langzaam het weefsel in. Daar dergelijke concentraties in een levend en gezond Tabaksblad nooit voorkomen (0.02 tot 0.05 % is daarin nl. de gewone concentratie van alle suikers samen), kan suiker als transportstof in het jonge levende Tabaksblad nooit een rol van eenige betekenis spelen.

Alvorens over te gaan tot de resultaten bij de chemische analyse van bladen in verschillende suikerconcentraties verkregen, wil ik nog even wijzen op een proef van RYWOSCH (70, 71) waaraan in de laatste druk van BENECKE—JOST (4) m.i. een veel te groote waarde wordt gehecht. RYWOSCH, die zoekt naar oorzaken, welke in het blad de diffusie kunnen versnellen, meent deze te vinden in een eigenschap, die het blad zou bezitten, om regulatorisch zetmeel te vormen. RYWOSCH legt Pinusbladen, waarvan aan één zijde de cuticula verwijderd werd en Hyacinthenbladen, waarvan aan één zijde de epidermis werd afgestroopt in 9 % rietsuiker bij 15—16° C. Het meeste zetmeel treedt in de zetmeelscheede op, maar dit weefsel laat RYWOSCH verder buiten beschouwing. Hij kijkt naar de rest van het parenchymatische weefsel en bemerkt, dat aan de verwonde zijde na 3 dagen minder zetmeel voorkomt dan aan de andere zijde, waar de opperhuid aan gelaten is en waar heen dus geen suiker is kunnen komen, dan door het parenchymatische weefsel van de zijde der afgestroopte opperhuid heen. Hieruit concludeert RYWOSCH: „Ein Pflanzenorgan, wenigstens ein Blatt, ist imstande,

regulatorisch Diffusionsströme zu bilden'', m.a.w. om de diffusie te versnellen, legt een blad zetmeel vast, als dit te pas komt, op de plaatsen, waar dit voor het diffusieveral gunstig is. Aan deze doelmatigheidsbeschouwingen knoopt RYWOSCH nu uitweidingen vast over het koolhydratentransport in bladen, kotyledonen, enz. Daargelaten het problematische dezer heele beschouwing, is het feit, waarop RYWOSCH zijn heele theorie baseert, n.l. de sterkste zetmeelvorming ver van de indringingsplaats af, verkeerd gezien of verkeerd geïnterpreteerd. Wij hebben bij verschillende bladsoorten en verschillende concentraties van dag tot dag de zetmeelvorming nagegaan en deze precies zoo gevonden, als BOEHM (9) deze voor 't eerst beschreef, toen hij zei, dat het eerst en het sterkst zetmeel ontstaat „in der Nähe von Schnitträndern und längs der durchgeschnittenen Rippen''. En ook SAPOSCHNIKOFF (73) beschrijft de zetmeelvorming uit suikeroplossingen (in *Nicotiana*-bladen) zooals ik die waarnam (bij de lagere concentraties): „Wenn man ein 1—3 Tage auf Zuckerlösung gelegtes Blatt mit Jod behandelt, so bildet sich ein schwarzer Saum längs den abgeschnittenen Blatträndern, während die Mitte farblos bleibt'' en ook zijn opmerking: „Diese Bewegung von Parenchymzelle zu Parenchymzelle geht langsamer vor sich als die Bewegung in den Nerven'' stemt volkomen met mijne waarneming overeen. Slechts bij hypertonische concentraties vond ik langs de sneden minder zetmeel, dan dieper in het blad, echter ook dan weer, omdat dieper in het blad de schadelijke hypertonische suikerconcentratie eerst *later* bereikt wordt. De waarneming van RYWOSCH is onjuist of hij heeft door het afstroopen der opperhuid een reeks onderliggende cellen beschadigd, die daardoor sterven en geen zetmeel meer vormen. Het is waarschijnlijk dat dit oorzaak geweest is van de theorie der „regulatorische Stärkebildung''.

Nog vermeld ik, dat ik de proeven met Hyacinthenbladen in suikeroplossingen heb nagedaan en daarbij hetzelfde vond als bij de andere bladsoorten: de indifferente gedooide zone direct langs de snede, de eerste en sterkste zetmeelvorming in de hieraan grenzende cellen, de schadelijke invloed van hypertonische suikerconcentraties op de zetmeelvorming. Bedoelde beschouwingen van RYWOSCH missen dus een experimenteelen en eigenlijk ook een logischen grondslag.

Voor het onderzoek van de uit de suikeroplossing in het blad gevormde koolhydraten was een iets andere inrichting van de proef noodig. Het leggen van de bladen op de suikeroplossingen was hierbij

niet mogelijk, omdat dan aan de bladoppervlakte zooveel suiker zou adsorbeeren, dat de uitkomsten een onjuist beeld zouden leveren van de koolhydraten in het blad aanwezig.

Daarom werden de suikeroplossingen in platte Petrischalen uitgeschonken, hierop werden blikken platen gelegd, waarin gleuven waren gemaakt, waar doorheen de bladen in de suikeroplossing kwamen te staan. Na 2 dagen bij 28° C. en ongeveer 75 % vochtigheid hadden de bladen bij deze concentraties zooveel suiker opgenomen, dat het beeld der zetmeelkleuring met de Jodiumproef zeer overeenkwam met de eindresultaten verkregen bij het leggen in suikeroplossingen. Alleen was de plasmolyse eerst bij 24 % glucose en 40 % saccharose duidelijk opgetreden.

Na twee dagen dus werden de bladen uit de suikeroplossingen genomen, het deel waaraan vloeistof kleefde zorgvuldig afgeknipt en de hoofdnerf als steeds verwijderd. De resultaten bij de analyse verkregen druk ik uit in milligrammen per 10 Gram versch gewicht. Doordat de bladen in de diverse suikeroplossingen verschillende hoeveelheden suiker tot zich trekken, en het drooggewicht dus zeer verschillend wordt, stelt het verschgewicht een minder variabele factor voor dan het drooggewicht, en voor de onderlinge vergelijking is uitdrukken in het verschgewicht dus overzichtelijker. Uit de bijgevoegde drooggewichtspercenten is omrekening op het drooggewicht trouwens nog steeds mogelijk.

Glucose.

TABEL 2

% glucose in de oplossing	Drooggewicht per 10 Gram versch blad	mGr. koolhydraten per 10 Gram verschgewicht				
		Totale suiker als glucose	Monose	Saccharose	Maltose	Zetmeel
Water (contr.)	448	2	×	×	×	—
1 %.....	583	11	—	—	10	4
4 %.....	547[691] ¹⁾	7 [8]	— [—	2 [2]	5 [6]	11 [×
7½ %.....	790	22	—	3	18	114
14 %.....	849	18	—	—	17	163
24 %.....	1022 [2889] ¹⁾	30 [69]	2 [13]	10 [22]	17 [31]	—
14% + 4% NaCl.....	1485	18	1	8	8	—

¹⁾ Duplo-proef, waarbij de zetmeelbepaling achterwege bleef.

Saccharose.

Vervolg TABEL 2

% Saccharose der oplossing	Droogge- wicht p. 10 Gram versch blad	mGr. koolhydraten per 10 Gram verschgewicht				
		Totale suiker als glucose	Monose	Saccha- rose	Maltose	Zetmeel
Voorproef.....	594	2	×	×	×	—
1 %	531	7	—	2	5	6
4 %	864	11	—	4	6	80
7½ %	980	28	1	14	12	147
24 %	1312	23	—	12	10	135
40 %	1403	94	15	75	—	—

Maltose.

4 %.....	595	7	1	2	4	84
24 %.....	1389	29	—	17	11	×

× = niet bepaald.

Zooals we opmerken, is het drooggewicht, dat voor de proef 5.94 % bedroeg in 2 dagen en 28° C. bij staan in water tot 4.48 % terug-ge-loopen, door verademing van organische bestanddeelen, hoewel niet van koolhydraten, daar zetmeel in beide niet voorkomt en het suikergehalte even laag blijft als het was.

Verblijf in 1 % saccharose heeft een zoo groote daling van het drooggewicht kunnen voorkomen, maar toch is het nog achteruit-gegaan. Hetzelfde geldt voor 1 % glucose. Bij alle andere concen-traties is het drooggewicht der bladen belangrijk toegenomen door het opnemen van suikers uit de oplossing. Bij 40 % saccharose en 24 % glucose heeft bovendien de wateronttrekkende invloed der hypertonische oplossingen het drooggewichtspersent opgevoerd zonder dat echter een evenredige hoeveelheid suiker opgenomen is.

Het is bij de toevoer van glucose buitengewoon opvallend, dat we nochtans geen glucose in het blad aantreffen in een kwantiteit, die met de gevolgde methode bepaalbaar is. Zoo zijn b.v. bij 7½ % glucose per 10 Gram verschgewicht eenige honderden mGr. glucose opgenomen in het bladweefsel, maar nog geen mGr. is hiervan terug te vinden. Wij komen dus tot de conclusie, dat bij 28° C. in de paren-chymcellen van Tabaksblad omstandigheden heerschen, die het bestaan van monosen onmogelijk maken. Dadelijk bij het binnen-dringen van eenige glucose in de cellen wordt deze dus omgezet tot andere verbindingen. Een groot deel dezer verbindingen is zetmeel,

voorts komt als tusschenproduct ook maltose voor, maar bovendien blijft steeds een rest over, die niet als koolhydraten is terug te vinden. Het is interessant het resultaat bij 7½ % glucose eens te vergelijken met de door assimilatie verkregen suikertoevoer. Na 11 uur belichting zagen wij het drooggewicht daar stijgen van 5.3 op 7.4 % (pag. 40), bij 7½ % glucose van 5.8 [4.5] op 7.9. Het drooggewichtsgehalte is tenslotte ongeveer hetzelfde, zoodat een vergelijking mogelijk wordt. ¹⁾

Gewichtsvermeerdering door opgenomen glucose per 10 Gr. versch gewicht 342 mGr. Hiervan toename	Gewichtsvermeerdering der door assimilatie ver- worven koolhydraten.... 210 mGr.
monose..... —	Toename
saccharose .. 3 mGr.	maltose 2 mGr.
maltose 19 mGr.	rest suikers... —
zetmeel..... 127 mGr.	zetmeel..... 103 mGr.
	<hr/>
Totale koolhydratentoe- name in bladweefsel 149 mGr.	Toename koolhydraten .. 105 mGr.
Toename niet-koolhydra- ten 193 mGr.	<hr/>
	Toename niet-koolhydra- ten 105 mGr.

Er zijn in beide uitkomsten duidelijke punten van overeenstemming. Zoowel van de door assimilatie, als door suikeroplossingen toegevoerde suiker (tot een drooggewicht van ongeveer 7½ % bereikt is) wordt slechts zoowat 50 % als koolhydraten teruggevonden, waarvan het grootste deel in den vorm van zetmeel. Monosen blijken bij 28° C. in de celomstandigheden niet bestaand, maltose komt voor; bij de uit oplossing toegevoerde koolhydraten meer dan bij assimilatie. Een groot deel van de toegevoerde koolhydraten wordt steeds direct bij intreden in de cel tot verbindingen omgezet, die geen koolhydraten zijn. Het is niet onmogelijk, dat het deze verbindingen zijn of een deel van deze verbindingen, die bij het transport der organische stoffen de voornaamste rol spelen. Indertijd heeft ZALESKI (103 en 104) toename van eiwitten uit suikeroplossingen aangetoond in *Helianthus*bladen, BÜSGEN (11) van looistoffen, ADOLF MAYER (48) zag de nicotine in Tabak bij assimilatie vermeerderen, terwijl het tevens niet onmogelijk is, dat ook organische zuren gebonden aan K of Na een rol bij het transport zouden kunnen spelen. De organische zuren komen in Tabak, zoo-

¹⁾ Alles berekend als monosen.

als KISZLING (39) toonde in belangrijke hoeveelheid voor en dus voldoen de organische zuren tenminste aan de allereerste eisch, welke we aan een transportstof mogen stellen, dat zij in de plant in beteekenende hoeveelheid voorkomt. Voorts vinden wij in een onderzoek van JUL. MOHR (53) duidelijke aanwijzingen, dat het speciaal de K en NH_4 -zouten der organische zuren zijn, welke van het blad in den hoofdstengel kunnen overgaan (vergelijk pag. 107). Bij een volgend onderzoek zal dus met toename van deze verbindingen rekening moeten worden gehouden. Het viel bovendien op, dat het neerslag met basisch loodacetaat verkregen, des te meer was, naarmate de bladen langer geassimileerd hadden of in hogere suikerconcentraties hadden gestaan. Het was uit de dikte van het neerslag met basisch loodacetaat heel gemakkelijk de monsters te rangschikken naar de opvolgende suikerconcentraties, waarin de bladen gestaan hadden. Bij de hoogste concentraties, als zetmeelvorming uitbleef, bereikte dit neerslag zijn maximum en was het filtreeren dikwijls een vrij langdurige kwestie. In de reeks van verbindingen, welke met basisch loodacetaat neergeslagen worden (looistoffen, organische zuren, glycosiden, eiwitten) zullen we dus met kans op succes naar de organische stoffen kunnen zoeken, die mede direct uit de toegevoerde suikers ontstaan, en waarbij de verbindingen kunnen zijn, die als transportstof fungeeren.

Ik heb kunnen bewijzen, dat er in tabaksblad looistoffen uit glucose gevormd worden. Bij 21° C. plaatste ik 3 schalen met a) water; b) $7\frac{1}{2}\%$ glucose; 24% glucose. Hierin werden Tabaksbladen in het proefstadium door gleuven in blikken platen gestoken. Aldus bleven de bladen 3 dagen in 't donker staan. Daarna werd het onderste deel der bladen, dat direct met de suikeroplossing in aanraking was geweest, afgeknipt en de rest verzameld, versch gewogen, met kokende 96% alcohol gedood, bij 100° C. gedroogd en wederom gewogen. De looistoffen werden hierin vervolgens bepaald volgens de methode in LUNGE—BERL „Chemisch-technische Untersuchungsmethoden” aangegeven. Deze methode komt hierop neer, dat nagegaan wordt, welk deel van de in oplossing gaande bestanddeelen uit het blad, bij het passeeren van huidpoeder wordt weggenomen. Het resultaat was:

	Drooggewicht	Looistoffen in 10 Gram versch blad
In water 3 dagen 21° C. (donker)	3,2 %	21 mGr.
In $7\frac{1}{2}\%$ glucose als vorig.	9,3 %	164 mGr.
In 24 % glucose als vorig.	16,1 %	239 mGr.

Er komt bij deze resultaten nog ter sprake de kwestie der bij assimilatie primair gevormde koolhydraten. Wanneer men de hypothese van BAYER als werkwijze wil accepteren, zou het voor de hand liggen, dat als eerste koolhydraat glucose of in ieder geval een monose gevormd werd. Als resultaat van de geringe hoeveelheden glucose, die BROWN en MORRIS (10) in assimileerende *Tropaeolum* aantroffen, meenden zij echter, dat niet glucose het eerste bij de assimilatie gevormde koolhydraat was, maar zagen zij daarvoor eerder saccharose aan, omdat dit in veel grootere kwantiteiten in hun *Tropaeolum* bladen voorkwam. Het was theoretisch niet wel begrijpelijk, dat uit formaldehyd eerst saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$ zou ontstaan, maar toch kwam ook WENT (99) door het overwegend saccharosegehalte van *Saccharum officinarum*-bladen (tegenover de glucose en fructose) tot de conclusie, dat het waarschijnlijk is, dat rietsuiker het primaire bij de assimilatie gevormde koolhydraat is. Hetzelfde meent PARKIN (63) voor het Sneeuwkllokje en ook DAVIS c. s. (21) voor Biet en Aardappel. Uit de door mij verkregen resultaten blijkt ten duidelijkste, dat we uit de mate van voorkomen van bepaalde koolhydraten in het bladweefsel geen conclusies kunnen trekken over de koolhydraten, welke primair daarin zijn ontstaan. Ik weet immers bij mijn glucose-oplossingen *zeker*, dat de gewichtsvermeerdering een uitsluitend gevolg van opname van glucose is en toch vind ik bij onderzoek geen spoor glucose in het celsap terug, omdat dit direct bij zijn intreden wordt verwerkt tot andere verbindingen (vnl. zetmeel en nog onbekende verbindingen), welke onder die omstandigheden wél in de cel bestaanbaar zijn. Men kan het ontstaan van glucose in het Tabaksblad bij assimilatie in 28° C. vergelijken met het ontstaan van formaldehyd als tussenproduct bij de assimilatie. Het niet aantoonbaar zijn van formaldehyd in de plant is evenmin een bezwaar geacht voor de BAYERSche hypothese, als ik thans het ontbreken van glucose in het blad, als argument tegen het primair ontstaan ervan beschouw. Integendeel lijkt het op theoretische gronden, maar ook uit de groote overeenkomst tusschen het assimilatie-resultaat en de glucosetoevoer in 8 procentige oplossing waarschijnlijk, dat ook bij de assimilatie-toevoer eerst glucose ontstaat, dat dus glucose het eerste assimilatieproduct in den vorm van koolhydraten voorstelt.

Onlangs zag WEEVERS (98) dat bij bonte planten het gedeelte, dat vrij van bladgroen is, minder glucose bevat, dan het deel, dat wél door chlorophylkleurstoffen in staat is te assimileeren. Hieruit besloot WEEVERS, dat glucose wél het primaire gevormde koolhydraat zou zijn. Hoewel ik dit eveneens geloof en ook de resultaten

op zich zelf interessant zijn, acht ik de uitkomsten van WEEVERS om genoemde redenen evenmin een bewijs vóór bedoelde stelling, als ik die van BROWN en MORRIS (10) en van WENT er tégen vind pleiten. Het zijn nl. de enzym- en andere omstandigheden in de cel, die het voorkomen en de verhoudingen van de verschillende koolhydraatverbindingen bepalen, evenals het koolhydratenevenwicht in suikerplanten hierdoor in de richting van oplosbare koolhydraten, bij zetmeelplanten in den vorm van zetmeel wordt verschoven, al zal het eerste assimilatieproduct in beide hetzelfde zijn geweest. We leeren uit de resultaten van WEEVERS, dat de enzymverhoudingen in het bladgroenlooze deel anders zijn dan in cellen met chloroplasten, hetgeen het op geheel andere wijze verkregen resultaat van WILLSTÄTER en STOLL (100) bevestigt.

Terugkeerende tot de uitkomsten op pag. 53 wijs ik op de z.g. hypertonische concentraties. Bij 32 % glucose zien wij voor het eerst saccharose in eenigszins belangrijke hoeveelheid (1 % van het drooggewicht) optreden en ook een beetje monose. Te meer valt deze uitkomst op, wanneer wij 16 % glucose vergelijken met 16 % glucose + 4 % NaCl. In het tweede geval treedt ook thans onder invloed der plasmolyse saccharose in de plantencel op, vergezeld van een beetje monose, dat men zich gesplitst kan denken uit de saccharose. In bladen, welke in dezelfde concentratie suiker stonden zonder dat door 4 % NaCl de oplossing een plasmolyseerende werking veroorzaakte, treedt geen saccharose op, evenmin monose.

Zooals wij eerder zagen, moeten wij het niet vormen en het verdwijnen van zetmeel bij hoge suikerconcentraties, beschouwen als een gevolg van de plasmolyse. Parallel hiermede treedt in de plantencel saccharose op, vergezeld van een geringe hoeveelheid waarschijnlijk uit saccharose gesplitste monose.

Bij de bladen, die in saccharose stonden, vindt men meer saccharose terug, dan glucose in de bladen, welke in glucose stonden. Saccharose schijnt dus bij de gegeven omstandigheden beter bestaanbaar dan glucose, hoewel ook nog zeer weinig, want slechts 2 % vinden wij gemiddeld van al de toegevoerde saccharose in het bladweefsel terug. Alleen vindt men in een 40 % saccharose oplossing onder invloed der plasmolyseerende werking 8 % ervan terug. Ook hier ziet men dus *onder invloed der plasmolyse het evenwicht der koolhydraten in de richting van saccharose verschoven*. Tevens treedt wederom daarnaast gesplitst wat monose op.

Maltose schijnt in de Tabak nog het beste bestaanbaar te zijn

onder de gegeven omstandigheden. Overal zien wij het tenminste (als tusschenproduct tot zetmeel?) in eenige mate uit de toegevoerde suikers gevormd.

Dat bij 14 % saccharose en $7\frac{1}{2}$ % glucose tenslotte na 2 dagen de heele bladstukken ook vol zetmeel raken, kunnen we aldus opvatten, dat bij het indringen van deze groote hoeveelheden suikers in de eerste cellenlaag niet alles tot zetmeel, tannine, enz. verwerkt kan worden, maar een deel in den vorm van suiker bestaan blijft en wel in den vorm van maltose. Deze maltose dringt in de volgende cellenlaag. Zoo voortgaande is dan na eenige dagen in het heele blad maltose en daarmede zetmeel aanwezig. Anders is het bij assimileerende bladen. Hier ontstaat de suiker geleidelijk en regelmatig verdeeld in het geheele weefsel, terwijl een deel der gevormde producten worden afgevoerd en plaats maken voor nieuwe vorming uit de door assimilatie ontstane koolhydraten. Op deze wijze wordt ook het eenige verschil tusschen koolhydratensamenstelling van 11 uur assimileerende bladen en bladen, welke 2 dagen bij 28° C. in $7\frac{1}{2}$ % glucose stonden, nl. het hogere maltosegehalte (onder invloed van de van één zijde voortdurend in sterke concentratie indringende suikers) verklaarbaar.

VII. DE BETEKENIS DER KOOLHYDRATEN BIJ HET VOEDSELTRANSPORT.

Ik acht mijn resultaat, dat in een Tabaksblad de koolhydraten bij het transport niet betrokken zijn, van zoodanig belang, om er nog een oogenblik langer bij stil te staan. Zelfs bij concentraties 10 maal zoo groot als in de jonge Tabaksplant voorkomen ($\frac{1}{4}$ %), is er geen verplaatsing van eenige beteekenis.

Nu is het in meerdere opzichten nooit verklaarbaar geweest, dat zulke groote hoeveelheden koolhydraten belangrijke afstanden zouden afleggen in het plantenweefsel. Reeds HUGO DE VRIES (93) noemde de uiterst geringe diffusiesnelheid der suikers. Vandaar dat hij een oplossing zocht in de plasmastroomingen, die de suikers in de plantencel zouden doen verspreiden. Later toonde echter BIERBERG (6), dat plasmastrooming allerminst een algemeene eigenschap van de plantencel is. Toen bewees RYWOSCH (72) dat bij aanwezigheid van saccharose en glucose naast elkaar, de diffusiesnelheid der glucose met 8 % vermeerderd ¹⁾. Dat dit echter een veel te geringe snelheidsvermeerdering beteekent, om 't verschijnsel te verklaren, was ook RYWOSCH (70) duidelijk. Hij meende echter bovendien nog twee andere feiten te kunnen vermelden, welke de diffusie in de plantencel zouden versnellen. Hij stelde zich voor, dat de zetmeelscheede, door de suikers vast te leggen tot zetmeel, 't concentratieverval vergrootte. Al was dit waar, dan kon men het vastleggen van zetmeel in het weefsel, dat volgens hem en anderen als transportbaan fungeerde, toch weer allerminst als gunstig voor de verplaatsing van de koolhydraten beschouwen! Als derde bevordering der diffusie noemde hij dan de transpiratie. Hij zag nl. in uitdrogende bladen het zetmeel afnemen en redeneerde daarbij als volgt: uitdroging door waterverlies beteekent ook versnelde transpiratie, dus toevoer van water uit de wortels. Dit ver-

¹⁾ 2% glucose vergeleken met 2% glucose + 2% saccharose.

meerdert het concentratieverval en versnelt den afvoer en het zetmeelverlies. Het feit der zetmeelverdwijning bij uitdroging had RYWOSCH juist gezien, maar de verklaring van het verschijnsel was onjuist. We zullen nl. met proeven bewijzen, dat transpiratievermeerdering niet gepaard gaande met uitdroging, de zetmeelomzetting niet bevordert. De uitdroging *zelf*, ook in afgesneden bladen, (waar van transport dus geen sprake is), is het, die de omzetting van zetmeel versnelt. Geen der ideeën van RYWOSCH kan ik als oorzaak van diffusieversnelling aanzien. Maar zelfs als de snelheid der diffusie *in* de cel verklaard zou kunnen worden, was er nog een ander probleem op te lossen, nl. de diffusie door de plasmamembranen heen. Het is algemeen bekend dat bij hypertonische suikeroplossingen plasmolyse optreedt in de plantencel; men weet dus dat de suikers uiterst moeilijk of in 't geheel niet door de membranen heengaan. En toch spreekt men in de botanie geregeld over het transport der koolhydraten, alsof dit de gewoonste zaak van de wereld is, waarschijnlijk in de hoop, dat eenmaal de oplossing zal worden gevonden van deze thans nog volkomen onoplosbare moeilijkheden.

Het komt mij nu echter mogelijk voor, dat we het heele verschijnsel van het transport van organische stoffen in andere verbindingen moeten zoeken dan in de koolhydraten. Eerder komt men tot de conclusie, dat de suikers door assimilatie of door omzetting uit andere verbindingen gevormd in de plantencel bijna even onverplaatsbaar zijn vastgelegd als het zetmeel.

Bij de Tabak zagen wij, dat zelden de koolhydraten in eenige belangrijke concentratie voorkomen, en dat dus andere verbindingen de rol van transportstof moeten spelen; voorts merkten we, dat wanneer zij zelfs in eenige belangrijke mate voorkomen, de verplaatsing nog maar zeer langzaam geschiedt.

Zou hetgeen ik bij Tabak vond van meer algemeene geldigheid zijn, dan werden hiermede verschillende problemen eerder duidelijker, dan moeilijker verklaarbaar, b.v. de ophooping van saccharose in den suikerrietstengel en van saccharose in de knol der suikerbiet.

In bedoelde organen hoopen zich groote hoeveelheden saccharose gedurende het leven van de plant op. De saccharose moet als zijnde organische stof (wellicht in anderen vorm) in de bladen van de plant zijn ontstaan. Daar echter het gehalte aan saccharose in de bladen geringer is, aan 't eind der vegetatieperiode zelfs zeer veel geringer, dan in den rietstengel of bietenknol, is het niet makkelijk te begrijpen, hoe bij een dergelijk concentratieverval in de richting van het blad, zich daarentegen toch maar voortdurend saccharose

(die tenslotte uit het blad afkomstig moet wezen) in deze organen ophoopt. Bestond er zoo iets als een vrije diffusie der saccharose, dan zou de saccharose zich juist in de omgekeerde richting bewegen. Het is door dit feit m.i. toch vrij duidelijk, dat hier dan ook van een verplaatsing der saccharose geen sprake is, dat deze suiker er even onverplaatsbaar opgehoopt ligt als het zetmeel in de Aardappelknol. Hoe moet men zich dan het ontstaan der saccharose in deze cellen voorstellen? Zou men ook bij deze planten kunnen vinden andere verbindingen, welke onder invloed der assimilatie ontstaan en die wel makkelijk door de plasmamembranen diffundeeren, dan kon men een stroom van organische stoffen verwachten van het blad (waar zij voortdurend ontstaan) naar den stengel en zooals bij de Biet, naar de knol. Zou in deze organen in den tijd der ophooping bovendien nog saccharose uit bedoelde organische transportstof(fen) gevormd worden, dan bleef het concentratieverval bewaard en had een voortdurende stroom van organische stoffen plaats naar de reserveorganen, waarin zich de saccharose, als zijnde slecht verplaatsbaar, opzamelde. In het voorjaar, bij veranderingen van de enzymatische samenstelling, kon bij de Biet (zooals bij den Aardappel) het omgekeerde geschieden: terugvorming van de organische transportstof(fen), welke zich naar de jonge spruiten bewegen en door de groei verbruikt worden.

Het is o.a. RUHLAND (69) geweest, die zich uitvoerig met de suikers en met de physiologie van *Beta vulgaris* bezig hield. Hij zei, om te weten hoe de verplaatsing der suikers geschiedt, daarvoor moeten twee dingen in de eerste plaats onderzocht worden, n.l.: 1e. Hoe is de permeabiliteit der cellen van *Beta vulgaris* voor de diverse suikers; 2e. Hoe is het concentratieverval der weefsels in verband met iedere suikersoort.

Het bleek hem nu uit plasmolysebepalingen, dat de permeabiliteit voor suikers bij de cellen der verschillende weefsels uiterst gering was. Ook de zeefvaten bleken niet meer doorlaatbaar voor de suikers, en wegens hun nauwte kunnen ze geen functie van beteekenis bij het koolhydratentransport vervullen, hetgeen ook DIXON (23) onlangs met eenvoudige berekeningen heeft aangetoond. De doorlaatbaarheid der cellen uit de knol voor de suikers was nog geringer dan voor de cellen van blad en stengel. Het zijn deze uitkomsten van RUHLAND, welke m.i. ook wel aantoonen, dat het belangrijke transport der organische stoffen naar de knol niet in den vorm van koolhydraten kan geschieden. De zeer geringe doorlaatbaarheid der cellen uit de knol verklaart dan de mogelijkheid van de ophooping der saccharose in dit weefsel,

zonder dat dit wegstroomt naar stengel en bladen. Bij het concentratieverval der suikers, merkt RUHLAND op, dat de overgang van stengel in knol nooit in den vorm van saccharose zal kunnen plaats hebben, omdat de concentratie ervan juist naar de knol toeneemt en dus dan een stroom tegen het concentratieverval in zou moeten plaats hebben. Daarbij maakt RUHLAND dan de juiste opmerking, dat het voorkomen van de suikers eigenlijk ook nog allerm minst zegt dat ze ook in dezen vorm stroomen. Wanneer wij in vele cellen het zetmeel vinden overheerschen, zeggen wij toch ook niet, dat het zetmeel hier transportstof is. Men moet zegt R. „immer die Möglichkeit ins Auge behalten, dass dieselben nur vorübergehend dort durch Umlagerung, bezw. Kondensierung entstanden sind”.

Wanneer wij nu weten, dat de koolhydraten ook bij de Biet moeilijk van cel tot cel diffundeeren, en we zien toch in bepaalde plantendeelen groote hoeveelheden ervan opgehoopt, dan moeten wij m.i. aannemen, dat zij in anderen organischen vorm binnengedrongen zijn in de cel, en daaruit dan door meer of minder volledige omzetting ontstaan zijn.

VIII. PROEVEN OVER DE VORMING VAN ZETMEEL UIT SUIKEROPLOSSINGEN BIJ $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C.

Bladstukken van Tabak en Tropaeolum werden in het proefstadium (juist zetmeelvrij) in verschillende glucose en saccharoseoplossingen gebracht bij $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C. Bij Tabak kon in geen der concentraties, ook in die, waarbij in 28° C. de zetmeelvorming maximaal was, zetmeelafzetting worden waargenomen. Zelfs na een maand kon in de frisch gebleven bladen, noch in het mesophyl, noch in het schorsparenchym microscopisch zetmeel worden aangetroffen.

Bij Tropaeolum was dit anders. Het eindresultaat na 4 weken was als volgt. In:

Saccharose. (Na de Iodiumproef van SACHS).

- 1 %. Uiterlijk geen waarneembare zwartkleuring. Microscopisch treft men in het mesophyl sporen zetmeel aan; de schorsparenchymcellen zitten echter vol zetmeel. Het zetmeelgehalte is ongeveer als bij 0.05 % saccharose in 28° C.
- 4 %. Uiterlijk eenige zwartkleuring langs de sneden.
- $7\frac{1}{2}$ %. Het mesophyl langs de nerven flink met zetmeel gevuld.
- 14 %. Het heele blad vertoont een vrij sterke, hoewel niet pikzwarte kleur.
- 24 %. Schorsparenchymcellen nog hier en daar zwart, gewone parenchymcellen slechts sporadisch eenige zetmeelkorreltjes.
- 40 %. Nog iets zwart getint zoover mogelijk van de sneden af.

Glucose.

- 1 %. Microscopisch sporen in de mesophylcellen; schorsparenchym propvol zetmeel.
- 4 %. Als bij saccharose 4 %.
- $7\frac{1}{2}$ %. Uiterlijk reeds vrij zwart.
- 14 %. Het bladgedeelte zoover mogelijk van sneden en nerven verwijderd eenigszins zwart gekleurd.

24 %. Schorsparenchymcellen nog hier en daar zwart, gewone mesophylcellen nergens een spoor van zwartkleuring.

Het niet optreden van zetmeel bij Tabak zou kunnen liggen aan niet binnendringen van suiker bij $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C. Om dit na te gaan, moesten drooggewichts- en suikerbepalingen worden uitgevoerd.

Na 28 dagen verblijf bij deze temperatuur leverde de analyse der bladen het volgende op ¹⁾:

Glucose:

TABEL 3

	Drooggewicht per 10 Gram verschgewicht	mGr. suiker per 10 Gram verschgewicht			
		Totale suikers (als monose)	Monose	Saccharose	Maltose
Voorproef ..	516	1	—	1	—
1 %	392	2	2	—	—
4 %	545	2	2	—	—
$7\frac{1}{2}$ %	641	9	6	3	—
14 %	775	21	9	11	—
24 %	1291	161	71	82	—
<i>Saccharose:</i>					
1 %	384	1	—	1	—
4 %	561	102	—	97	—
14 %	919	128	5	117	—
24 %	1339	321	13	293	—

Vergelijken we dit resultaat met wat bij 28° C. gevonden werd, dan treden direct groote verschillen voor den dag. Evenals bij 28° C. blijkt het echter, dat belangrijke hoeveelheden suiker in het weefsel zijn binnengedrongen. De voornaamste afwijkingen:

1. in tegenstelling tot bij 28° C. is *geen zetmeel en ook geen maltose gevormd*;

2. van de ingedrongen suikers is veel meer terug te vinden in oorspronkelijken vorm dan bij 28° C.; bij de glucose echter minder dan bij de saccharose.

Bij de chemische analyse bleek ook thans wederom het neerslag met basisch loodacetaat des te zwaarder uit te vallen naarmate de suikerconcentratie der oplossing grooter was geweest. Ook bij

¹⁾ De weging van de bladen (versch) geschiedde bij $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C., daarna werden ze in kokende alcohol gedood en verder gedroogd.

$1\frac{1}{2}^{\circ}$ C. zijn dus uit de toegevoerde suiker nog verbindingen gemaakt, welke basisch loodacetaat neerslaat.

Wat wij dus constateeren is, dat het koolhydratenevenwicht onder invloed der lage temperatuur geheel verschoven is. Zetmeel en maltose (dat wellicht het tusschenproduct tot zetmeel vormt) zijn thans niet in de cel bestaanbaar. Monosen zijn, hoewel nog weinig, toch eenigszins bestaanbaar, terwijl van de saccharose een veel grooter gedeelte in oorspronkelijken vorm is aan te treffen. In ieder geval is, evenals bij 28° C., ook bij $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C. glucose nog veel labiel dan rietsuiker. Uit de rest der binnengedrongen suikers zijn producten ontstaan, welke zeker voor een deel behooren tot de met basisch loodacetaat neergeslagen verbindingen.

Bij $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C. heeft de synthese van zetmeel in het Tabaksblad zelfs bij den gunstigsten koolhydratentoevoer opgehouden.

Wat *Tropaeolum* betreft, ook daarbij is een verschil met de hoogere temperatuur waar te nemen, al is hier de zetmeelsynthese niet *volkomen* gestopt. Bij de gunstigste concentraties bevindt zich echter lang zooveel zetmeel niet in de bladen als dit bij hoogere temperaturen het geval was, terwijl ook de grens van zetmeelvorming hier bij $\frac{1}{2}$ tot 1 % saccharose en glucose ligt, terwijl deze bij 28° C. bij zoowat $\frac{1}{40}$ % dezer oplossingen lag! Ook hier is dus duidelijk het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker door de lage temperatuur in de richting van zetmeelafbraak begunstigd. Het enzym van de zetmeelsynthese is blijkbaar veel gevoeliger voor de lage temperaturen, dan het hydrolyseerende enzym.

Overigens zien wij weder bij de hypertonische concentraties door de plasmolyse het zetmeel verdwijnen. En ook hier bij $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C. zijn de leukoplasten der schorscellen zoowel bij lagere als bij hypertonische concentraties wederom eerder in staat zetmeel te vormen dan de gewone parenchymcellen.

Deze uitkomsten sluiten zich bij resultaten van andere onderzoekers aan. CZAPEK (15) zag in den winter, dat de huidmondjes van verschillende planten geen zetmeel meer bevatten. Het brengen bij 17° C. drijvend op water, deed in het donker het zetmeel weder optreden. Hij nam ook eenige proeven met het leggen van bladen op verschillende suikerconcentraties bij 17° C. en bij 1° C. Uit de verkregen resultaten concludeert hij: door lagere temperaturen wordt de suikerconcentratie, waarbij de eerste zetmeelvorming optreedt, omhoog gedreven. Dit is hetzelfde wat we bij Tabak en *Tropaeolum* vonden en dit kan men ook aldus uitdrukken, dat lage temperaturen het evenwicht: suiker \rightleftharpoons zetmeel in de richting van hydrolyse begunstigen.

Een ander bekend verschijnsel is het optreden van suiker in

het hout van verschillende boomen in den winter (BÜSGEN, 11).

LIDFORSS (42) deed dergelijke proeven als CZAPEK bij in den winter groene planten. In de sluitcellen der huidmondjes bevond zich geen zetmeel. Door het overbrengen van de bladen in een donkere kamer bij 33°C ., was reeds na $\frac{1}{2}$ uur zetmeel aan te toonen. Uit plasmolysebepalingen concludeerde hij, dat het suikergehalte bij de lage temperatuur in de huidmondjes waarschijnlijk groot was, daar het extract van het blad bovendien een duidelijk koperoxyduulneerslag gaf. LIDFORSS meende, dat gebrek aan zuurstof door het gesloten zijn der huidmondjes bij deze temperatuur de zetmeelvorming belet. Ik heb onder een luchtpomp bij 17°C . in suikeroplossingen zetmeel zien vormen, evenals bij normalen luchtdruk. Het is dus de vraag of zuurstofgebrek de zetmeelopbouw remt.

Trouwens wanneer LIDFORSS zich voorstelt, dat het brengen in hooge temperaturen de zuurstoftoetreding en daarmee de zetmeelvorming bevordert, dan is dit met zijn eigen waarnemingen in strijd. Want hoewel hij dan reeds na $\frac{1}{2}$ uur zetmeel ziet optreden, neemt hij daarnaast waar, dat de huidmondjes zoo hermetisch gesloten zijn, dat het in een warme kamer wel 10 dagen duurt eer zij zich openen. Het is dan ook veel waarschijnlijker, dat het ontbreken van zetmeel in lage temperaturen bij de wintergroene flora zijn oorzaak vindt in de verschuiving van het evenwicht: suiker \rightleftharpoons zetmeel in de richting van suiker, door eenzijdigen schadelijken invloed der lage temperatuur op het synthetiseerende enzym.

MÜLLER—THURGAU (57, 58) deed een uitgebreid onderzoek naar het zoet worden der aardappels bij lage temperaturen. In de aardappelknollen, waarin het heele koolhydratenevenwicht in de richting van zetmeelafzetting verschoven ligt, heeft desondanks het brengen in temperaturen van $0-3^{\circ}\text{C}$. vorming van glucose en saccharose ten gevolge, ten koste van het zetmeel. Uit het mooie onderzoek concludeert MÜLLER—THURGAU, dat temperatuursverlaging de ademhaling vermindert (dus ook de suikerverdwijning), maar tevens de zetmeelafbraak minder remt, dan de zetmeelopbouw, of m.a.w. de zetmeelsynthese heeft een grootere temperatuurscoëfficiënt dan de zetmeelhydrolyse. Dit is met eenigszins andere woorden volledig hetzelfde als wat voor het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker bij bladen van *Tropaeolum* en *Tabak* door mij gevonden werd. Wanneer MÜLLER—THURGAU zoet geworden aardappelen overbracht van 1° bij 25°C . dan zag hij ondanks de versterkte ademhaling (koolhydratenverlies) het zetmeelgehalte stijgen ten koste der suikers. Dit is geheel analoog aan de zetmeelvorming van de huidmondjes bij overbrengen van het vriespunt in een heet vertrek.

IX. HET VERDWIJNEN VAN HET ZETMEEL IN BLADEN BIJ VERSCHILLENDE TEMPERATUREN.

Hebben wij ons in het voorafgaande vnl. bezig gehouden met omstandigheden, waarbij de opbouw de hydrolyse van het zetmeel overtrof en dus zetmeelvorming resulteerde, thans willen wij nagaan eenige voorwaarden, waarbij de afbraak sneller plaats heeft dan de opbouw en het in het blad aanwezige zetmeel geleidelijk eruit verdwijnt. Dit gebeurt als geen toevoer van koolhydraten van buiten af plaats heeft, om het verlies door ademhaling (en afvoer) aan te vullen, dus in het algemeen wanneer de plant in donker staat.

Het was thans de bedoeling na te gaan in hoeverre de omzetting van zetmeel onder verschillende omstandigheden, in de eerste plaats bij verschillende temperaturen, plaats vindt. Er is hierover in de litteratuur heel weinig te vinden. De proeven van SACHS (76) zeggen ons, zooals reeds eerder opgemerkt, daarover vrijwel niets. HUNGER (34) deed in Deli proeven met Tabak, en omdat de weersomstandigheden vooral ten opzichte van de temperatuur niet zoo variabel zijn als in Europa, laten zij eerder conclusies toe, dan de proeven van SACHS.

Bij nachten met een lagere temperatuur dan 22° C. verdwijnt het zetmeel niet geheel uit de bladen, bij hogere temperatuur wel, dus meent HUNGER „dat voor de zetmeelafvoering uit het blad de temperatuur de voornaamste factor is”. Hoewel dit niet zeer gelukkig uitgedrukt is (zetmeelverdwijning en zetmeelafvoer blijken dingen, die men geheel moet scheiden van elkaar; verder zijn er nog andere factoren, welke minstens even belangrijk voor de omzetting van het zetmeel zijn) bedoelt HUNGER dus, dat de temperatuur de verdwijning van het zetmeel bevordert.

Tropaeolumplanten, welke buiten waren opgegroeid in potten, werden op een zonnigen middag overgebracht in drie verschillende temperaturen, n.l. naar $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C., 17° C. en 28° C. De groote variabiliteit in het zetmeelgehalte en in de snelheid van zetmeelomzetting

demonstreerde zich hier duidelijk. Nagegaan werd na welken tijd ze gemiddeld een stadium I en een stadium II bereikt hadden. Dit was:

		I	II
bij	1½° C. na	64 uur	175 uur
	17° C. na	40 „	105 „
	28° C. na	24 „	64 „

Hieruit scheen de waarneming van HUNGER bevestigd te worden. Duidelijker kwam dit uit bij de gelijk voorbehandelde Tabaksbladen, welke in het proefstadium met 24000 kaarsen respectievelijk 4½ uur en 11 uur waren belicht. Deze proeven geschiedden dus met bladen, welke een gelijke voorbehandeling hadden ondergaan en een bepaalde hoeveelheid zetmeel hadden gevormd. Deze planten werden na de belichting bij 1½° C. 10°, 17° en 28° C. overgebracht en de zetmeelverdwijning nagegaan. Bepaald werd, wanneer in de verschillende temperaturen bepaalde stadia I, II en III (geheel ontkleurd) bereikt waren:

TABEL 4.

4½ uur belicht met 24000 MK. in een temperatuur van 28° C.

Het zetmeel gehalte bereikte:	I	II	III
In 28° C. na	3 uur	7 uur	15 uur
In 17° C. na	5 „	10 „	23 „
In 10° C. na	12 „	20 „	45 „
In 1½° C. na	25 „	42 „	105 „

11 uur belicht met 24000 MK. in een temperatuur van 28° C.

Het zetmeel gehalte bereikte:	I	II	III
In 28° C. na	4½ uur	12 uur	28 uur
In 17° C. na	9 „	24 „	65 „
In 10° C. na	15 „	50 „	110 „
In 1½° C. na	43 „	115 „	210 „

Uit deze proeven met bladen, welke voordat zij in 't donker bij verschillende temperaturen werden geplaatst een gelijke voorbehandeling hadden ontvangen, en die door gelijke assimilatie eenzelfde hoeveelheid zetmeel bevatten, blijkt ten duidelijkste, dat het verdwijnen van het zetmeel door de temperatuur wordt versneld. Bij

70 *Verdwijnen van Zetmeel bij verschillende Temperaturen.*

11½° C. is 8 tot 10 maal zooveel tijd noodig om dezelfde hoeveelheid zetmeel uit het blad te doen verdwijnen als bij 28° C., m.a.w. de temperatuurscoëfficiënt Q_{10} = ruim 2.

Het belangrijke bij deze resultaten was voorts, dat de groote variabiliteit in de zetmeelomzetting bij ééNZelfde temperatuur door de gelijkmatige voorbehandeling thans geëlimineerd was. Bij één temperatuur verloren de jonge bladen aan de plant nu namelijk zeer gelijkmatig hun zetmeel.

Wij moeten ons voorstellen, dat naast elkaar in de leukoplasten plaats hebben, de hydrolyse van zetmeel en de opbouw van zetmeel. Laten wij een met zetmeel gevuld blad in het donker aan zich zelf over, dan blijkt, dat het zetmeel verdwijnt. Zouden de producten der hydrolyse in de cellen aanwezig blijven, dan was het te verwachten, dat tenslotte een evenwicht intrad tusschen suikers en zetmeel. Nu leerden de bepalingen echter, dat er geen evenwicht intreedt, integendeel, dat zich voortdurend zetmeel omzet, en vooruitlopende op de resultaten uit tabel 6, dat er daartegenover geen suikervermeerdering plaats heeft, maar een geringe vermindering der reeds kleine suikerconcentratie van het celsap. Wij worden dus gedwongen tot de conclusie, dat in het Tabaksblad bij het staan in 't donker bij 28° C. de suiker voortdurend aan de cel wordt onttrokken, waardoor de afbraak van het zetmeel geregeld voortgang kan vinden. Daartegenover wordt bij assimilatie voortdurend zooveel suiker in de cel aangevoerd, dat een deel ervan in zetmeel wordt omgezet en de opbouw van het zetmeel zodoende overweegt boven de hydrolyse en de onttrekking, waarvan we moeten aannemen, dat deze ook tijdens de assimilatie geregeld plaats vinden.

Het is niet zeker, dat bij alle planten dit verschijnsel aldus verloopt. Men kan zich ook voorstellen, dat onder invloed van de donkerte hetzij de opbouw-, hetzij de afbraakreactie wordt begunstigd, dat zich dus het enzymatisch evenwicht zetmeel \rightleftharpoons suiker onder invloed der veranderde enzymhoeveelheden verschuift. BROWN en MORRIS (10) bemerkten, dat de diastatische werkzaamheid van gedroogde Tropaeolumbladen toenam in 't donker. Zij dachten zich dientengevolge het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker in de richting van suiker verschoven, wanneer de planten in het donker worden gezet; en ook zonder het onttrekken van suiker, zou dus dan de omzetting van het zetmeel in 't donker kunnen plaats grijpen. Het resultaat, dat dan zou kunnen optreden, is toename van suikers in de cel, wat BROWN en MORRIS ook vonden. Toch zegt, zooals nog nader zal worden besproken, de diastatische werking van gedroogd blad weinig over de diastatische werking in het blad

zelf. Bovendien is het niet te bewijzen of ook niet de opbouwreactie door het donker wordt versneld. De beste wijze om een eventuele verschuiving van het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker door veranderde werking der enzymen te constateeren bestaat m.i. in het nagaan van de vorming van zetmeel uit suikeroplossingen in het donker bij bepaalde omstandigheden. Zien wij na b.v. twee dagen in 't donker, de zetmeelvorming langzamer plaats grijpen, of eerst bij hogere concentraties optreden, dan kunnen wij de conclusie trekken, dat de enzymverhoudingen verschoven zijn, zooals ik dit bij Tabak, die bij $1\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. werd gebracht, kon constateeren. BROWN en MORRIS hebben dit echter niet onderzocht; bij Tabak heb ik het wel nagegaan en ik nam waar, dat de zetmeelvorming uit suikers zelfs na eenige dagen in 't donker bij 28°C . niet anders verloopt dan wanneer de bladen 18 uur in het donker hebben gestaan.

Bij Tabak moeten wij dus aannemen, dat voortdurend bij 28°C . suiker aan het evenwicht onttrokken wordt, waardoor dan bij stagnatie der suikertoevoer (door assimilatie of uit oplossingen) omzetting van zetmeel in het blad naar voren treedt.

Wij vragen ons nu, op welke wijze wordt suiker aan de cellen onttrokken?

We kunnen denken aan een volledige verademing, verder aan een afvoer der suikers. Het is het laatste waaraan men meestal in de handboeken de zetmeelomzetting toeschrijft, ja, vrijwel in alle publicaties wordt zetmeel*verdwijning* uit het blad geïdentificeerd met „zetmeel”*afvoer*, waarmede men dan bedoelt afvoer der afbrekingsproducten van het zetmeel. Al weten wij thans, dat suiker in het Tabaksblad niet aan het transport deelneemt, het ware toch mogelijk, dat suiker omgezet werd tot andere organische verbindingen, welke wel diffundeeren. Zelfs weten wij, dat ook een deel der bij de assimilatie gevormde suikers direct worden omgezet tot niet-koolhydraten (tannine, nikotine; eiwitten, organische zuren, gebonden aan K of Na?), en waarvan wij moeten aannemen, dat een deel dezer verbindingen de rol van transportstof spelen. Zouden deze verbindingen in het donker uit de suikers ontstaan en zouden deze verbindingen worden afgevoerd, dan kon opnieuw suiker zich omzetten en ook opnieuw zetmeel zich splitsen. Er staan ons dus in hoofdzaak twee mogelijkheden open, waardoor de suiker zou kunnen worden onttrokken:

1. verademing der suikers;
2. omzetting der suikers tot andere verbindingen, welke als transportstof worden afgevoerd, waardoor hernieuwde omzetting van suiker (en zetmeel) plaats vindt.

72 *Verdwijnen van Zetmeel bij verschillende Temperaturen.*

Ook is alweer mogelijk, dat beide verschijnselen tegelijk optreden, terwijl ook gedeeltelijke verademing denkbaar is, waardoor b.v. organische zuren konden ontstaan, welke tegelijk de transportstof zouden kunnen wezen.

Om na te gaan, in hoeverre één der beide verschijnselen overweegt, voerde ik de volgende eenvoudige proef uit. Er werd vergeleken de omzetting van het zetmeel uit bladen *aan* de plant met bladen los van de plant. Is het de afvoer, die de geheele onttrekking van suiker veroorzaakt — en daarmee de afbraak van het zetmeel — dan zou uit bladen los van de plant het zetmeel nooit geheel kunnen verdwijnen. In ieder geval geeft ons het verschil in tijd, noodig, om het zetmeel in bladen *aan* de plant en los van de plant te doen verdwijnen, een maat voor de sterkte, waarin we ademhaling of afvoer van omzettingsproducten van zetmeel voor de zetmeel-verdwijning moeten aansprakelijk stellen.

Eenige potten met planten, welke om 4 uur 's middags zooveel zetmeel bevatten, dat zij deze *aan* de plant in 18 uur bij 28° C. zouden verliezen, werden bij 28° C. geplaatst. Alle bladen werden van de helft der bladlamina beroofd, zoodat de andere bladhelft en met de nerf *aan* de plant bleven. De afgescheurde helften kwamen eveneens bij 28° C. in een vochtige omgeving, zonder dat zij in water stonden, afvoer van stoffen uit deze bladen was dus uitgesloten.

Nu werd de verdwijning van het zetmeel nagegaan. Terwijl de bladen *aan* de plant hun zetmeel in 18 uur kwijt waren, hadden de bladen, die niets konden afvoeren, hiertoe zoowat 22½ uur noodig¹⁾. Wel is de zetmeelomzetting dus iets langzamer gegaan, maar we zien, dat we in den afvoer onmogelijk de eenige oorzaak der zetmeelomzetting kunnen zoeken, integendeel is de omzetting voor 80 % ook *aan* een andere onttrekking toe te schrijven en ik acht het waarschijnlijk, dat de oorzaak dezer onttrekking dus in verademing van de suikers gezocht moet worden, waardoor de afbraak van het zetmeel voortgang vindt. De vraag is: is deze ademhaling werkelijk zoo sterk, dat dit het verdwijnen van het zetmeel kan verklaren.

Om na te gaan, of de zetmeelomzetting bij hogere temperaturen een functie van de ademhaling is, wilde ik door de ademhaling onmogelijk te maken, zien of dan het zetmeel niet verdween. Daar-

¹⁾ Later werd nog gecontroleerd of in een bladhelft zonder nerf en een bladhelft met nerf het zetmeel even snel verdween. Verschillen waren niet te constateeren.

toe werd evenals NEGER (60) deed, een flesch, waarin bladstukken vol zetmeel verbleven, gevuld met CO_2 . De flesch werd afgesloten en eenige dagen bewaard bij 22°C . Daarna bleek, dat geen zetmeel was omgezet, terwijl overeenkomstige bladen in vochtige lucht bij 28°C . hun zetmeel kwijt waren geraakt. Daar de CO_2 schadelijk kon hebben gewerkt op de levensfuncties der bladcellen, werd nog de volgende proef genomen. Afgeknipte bladstukken kwamen onder in uitgekookt water te liggen, boven afgesloten door olie en een kurk. Bij 22°C . bleef hierin zelfs na dagen het zetmeelgehalte onveranderd. In bladen, welke aan de lucht bij 22°C . op water dreven, was het zetmeel in dienzelfden tijd volledig omgezet. Het blijkt dus, dat het zetmeel zonder zuurstof niet wordt omgezet. Is hiermede het bewijs geleverd, dat de ademhaling de oorzaak der zetmeelomzetting is? Dit hoeft nog niet, want de mogelijkheid bestaat, dat de zetmeelhydrolyse niet zonder zuurstof kan plaats vinden. Om dit laatste na te gaan werd de volgende proef uitgevoerd. Bladen kwamen in een droge atmosfeer in CO_2 te staan en in een uitgekookte hypertoonische KNO_3 -oplossing (hetgeen hetzelfde is als uitdroging of wateronttrekking aan de cellen onder afsluiting van lucht).

Het is, zooals in het volgende hoofdstuk zal worden besproken een eigenaardigheid van drogende bladen, dat deze hun zetmeel omzetten ook zonder dat de suiker eerst wordt verademd. Onder de beschreven omstandigheden: droging en afsluiting der zuurstof trad nu eveneens geen zetmeelomzetting op. Hiermede wordt dus bewezen, dat *in de plant de diastatische functie niet plaats heeft zonder zuurstof*. Het komt dus door gebrek aan zuurstof in de cel nooit tot suikervorming, zoodat van verademing onder deze omstandigheden ook geen sprake kan wezen. Het is door afsluiten van de zuurstof dus nooit te bewijzen, of het zetmeel verademd wordt, en dus moet dit bewijs op indirecte gronden geleverd worden.

Alvorens dit te doen, zij nog opgemerkt, dat het mij gebleken is, dat takadiastase en dat bladpoeder van Tabak onder afsluiting van lucht en ook zelfs in koolzuur-atmosfeer zetmeel op gewone wijze afbreken. Hiermede wordt overduidelijk bewezen, dat wat in de cel zich diastatisch afspeelt heel iets anders is, dan wat dit poeder of „diastase” buiten de cel doet. In de cel is bij de diastasewerking blijkbaar het protoplasma op een of andere wijze direct in deze omzettingen betrokken, hetgeen BROWN en MORRIS (10) reeds als werkhypothese aanvaardden.

Uit de boven verkregen resultaten (bij 28°C .) blijkt, dat wat in $4\frac{1}{2}$ uur als zetmeel werd geassimileerd, in 15 daaropvolgende uren,

74 *Verdwijnen van Zetmeel bij verschillende Temperaturen.*

dus in totaal $4\frac{1}{2} + 15$ uur = $19\frac{1}{2}$ uur moest zijn verademd. Bij de tweede proef, dat wat in 11 uur was vastgelegd als zetmeel in zoowat $11 + 28$ uur = 39 uur door de ademhaling moest zijn verdwenen. De tijden, van zetmeelvorming tot zetmeelverdwijning verhouden zich dus in het eerste geval als $4\frac{1}{2} : 19\frac{1}{2} = 1 : 4.3$; in het tweede geval als $11 : 39 = 1 : 3.6$. Gemiddeld zou de snelheid der ademhaling zich tot die der zetmeelvorming verhouden als 1 : 4. Deze berekening is natuurlijk slechts globaal, omdat o.a. erbij aangenomen is, dat niet 80 % doch 100 % der zetmeelverdwijning op rekening der ademhaling is terug te voeren. Om een idee te krijgen, of de ademhaling zoo sterk zou kunnen wezen, daarover zeggen ons deze getallen echter wel iets. Er bestaan weinig proeven over de sterkte der ademhaling vergeleken met zetmeelvorming of assimilatie bij 28° C. In de studie van BLACKMAN en MATTHAEI kunnen we echter dienaangaande wel wat vinden. Daar wordt voor *Helianthus* aangegeven, dat per uur per 30 cM². bladoppervlakte bij 29° C. geassimileerd werd 0.0097 Gr. CO₂, waarvan tegelijk door verademing weer 0.0020 Gr. CO₂ vrij kwamen. De verhouding is hierbij dus als 1 : 4.9. Daar echter tenminste bij Tabak bij 28° C. slechts de helft in den vorm van zetmeel wordt afgezet, is de verhouding zeker nog gunstiger voor de sterkte der ademhaling. We kunnen dus zeggen, dat het zeer goed mogelijk is, dat al het zetmeel in zijn hydrolyseproducten volledig verademd wordt, zonder dat we abnormaal hoge waarden voor de ademhaling moeten aannemen. Integendeel stemmen deze waarden overeen met de ademhalingssterkte uit de uitkomsten van BLACKMAN en MATTHAEI (8).

In een studie van DELEANO (22) onder leiding van ARTHUR MEYER uitgevoerd over de ademhaling van *Vitis vinifera* vind ik bovendien een krachtigen steun voor de opvatting, dat het voornamelijk de ademhaling is, welke de omzetting van het zetmeel in het blad veroorzaakt. Hij werkt met afgesneden bladen van deze plant en bepaalt in het donker de verademde CO₂, en na verschillende tijdsintervallen het gehalte aan zetmeel, suikers, hemicellulose, totale stikstof, N in coaguleerbaren vorm, de ammoniakstikstof, de vrije zuren, enz. Hij komt tot de volgende conclusies. Tot 66 uur verdwijnt eigenlijk alleen zetmeel; vervolgens nemen ook de suikers zienderoogen af; als na 144 uur alle koolhydraten verdwenen zijn, nemen de vrije zuren en de eiwitstikstof af, welke laatste geheel in den vorm van oplosbare stikstof en ammoniakstikstof terugkeert. Tot 80 uur is de verademde CO₂ bij benadering gelijk aan de verdwenen koolhydraten; daarna ontwikkelt zich meer CO₂ dan er koolhydraten verdwijnen. Het onderzoek maakt in zijn opzet een

betrouwbaren indruk, alleen is de temperatuur niet erg constant gehouden ($\pm 20^\circ \text{C.}$). De resultaten bevestigen ons op geheel andere wijze verkregen resultaat, dat eerst de koolhydraten de producten voor de ademhaling vormen, dat dus zetmeel in het blad de functie van energie-materiaal vervult.

Ik kom tot het volgende resultaat: *Het zetmeel, dat zich in het Tabaksblad onder invloed der door assimilatie gevormde suikers heeft afgezet, doet ook in de afbrekingsproducten voor een zeer klein deel nog maar aan het voedseltransport mede; het zetmeel levert het materiaal voor de ademhaling en kan indien men er een functie in het blad aan toe wil schrijven, als energiemateriaal voor de cel worden beschouwd.*

We moeten als gevolg van dit resultaat nu echter ook inzien, dat het al of niet verdwijnen van het zetmeel uit het blad weinig of niets zegt over den afvoer van producten uit het blad, zooals tot nu toe ten onrechte gemeend werd. Uit resultaten met de Iodium-kleuring verkregen, oordeelde men uit zetmeelverdwijning steeds gelijk over den afvoer. En we zien thans in, dat SACHS, al had hij onder gelijke temperatuursvoorwaarden gewerkt, uit de snelheid der zetmeelverdwijning bij verschillende temperaturen nòg nooit eenige conclusie over den afvoer had mogen trekken. *Wel leert ons de snelheid der zetmeelomzetting, tenminste bij het Tabaksblad, iets over de sterkte der ademhaling!*

In het vorige zagen wij, dat we uit de verdeeling van het zetmeel in het blad geen conclusies kunnen trekken over den weg, die de afvoerproducten inslaan, thans merken we tevens, dat de sterkte der zetmeelverdwijning ook over de sterkte der afvoer in het algemeen niets zegt. Hiermede worden de resultaten van SACHS en SCHIMPER over transport en afvoer, maar ook de waarde van de methode van SACHS om deze verschijnselen te bestudeeren, sterk verminderd en dus zal men geheel andere (kwantitatieve chemische) methoden moeten gaan gebruiken om in deze kwesties inzicht te krijgen.

Er was nog een tweede verschijnsel, hetwelk duidelijk demonstreerde, dat 't niet de afvoer kon wezen, die de hoofdoorzaak van de zetmeelomzetting in het Tabaksblad kon zijn. Het bleek namelijk, dat bladen welke afgeknipt droog bleven liggen hun zetmeel sneller omzetten dan bladen, welke onder dezelfde omstandigheden vochtig aan de plant verbleven. Zooals ik in het volgende hoofdstuk uitgebreider zal bespreken, moeten we aannemen, dat het blad door indrogen de functie tot zetmeelopbouw verliest, evenals deze eigenschap bij lage temperaturen wordt verloren. De functie tot zetmeelomzetting blijft bij matige indroging behouden. Hierdoor

76 Verdwijnen van Zetmeel bij verschillende Temperaturen.

wordt het zetmeel snel afgebroken, en het was mogelijk, dat bij dit proces zoo snel suiker gevormd werd, dat dit laatste niet direct aan verademing zou ten prooi vallen.

Om dit na te gaan, werden suikerbepalingen bij verschillende temperaturen uitgevoerd. Uitgegaan werd van blad, dat aan een 11-urige belichting bij 28° C. had blootgestaan.

De resultaten bij 1½°, 5° en 10° C. verkregen, laat ik hier volgen

TABEL 5. 1)

Voorbehandeling	Vocht- gehalte	mGr. suikers per 1 Gram droge stof				Opmerking
		Totale suikers (berek. als monose)	Monosen	Saccharose	Maltose	
Vóór de proef ..	92.8 %	4	—	1	3	Vor dem Ver- suche.
1½° Celsius donker						1½° Celsius im Dunkeln.
4 dagen a. Plant	91.4 %	17	8	3	6	4 Tage an der Pflanze
4 „ droog..	89.4 %	24	8	9	5	4 Tage trocken abgeschnitten
4 „ nat, afgesn.	91.9 %	14	—	3	10	4 Tage abge- schnittt. feucht u. s. w.
11 dagen Plant..	91.9 %	9	5	4	—	
11 „ droog..	86.2 %	22	5	15	1	
11 „ nat, afgesn.	92.4 %	12	—	3	8	
17 dagen Plant..	93.3 %	12	1	5	5	
17 „ droog..	86.2 %	47	6	38	—	
17 „ nat, afgesn.	93.8 %	15	7	8	—	Bladeren vergeeld
5° Celsius donker						
4 dagen Plant..	92.6 %	18	—	3	14	
4 „ droog..	85.3 %	33	—	20	11	
4 „ nat, afgesn.	91.6 %	12	—	3	8	
11 dagen Plant..	94 %	8	1	3	4	
11 „ droog..	76.9 %	50	—	37	11	
11 „ nat, afgesn.	92.8 %	17	1	13	2	Blad. verg.
10° Celsius donker.						
4 dagen a. Plant	92.5 %	5	—	1	5	
4 „ droog..	86.6 %	14	1	11	1	
4 „ nat, afgesn.	91.5 %	9	—	3	6	
11 dagen Plant..	92.8 %	17	—	4	13	
11 „ droog..	15.1 %	94	2	76	12	
11 „ nat, afgesn.	93.2 %	47	3	29	13	Blad. verg.

1) Alle uitkomsten zijn afgerond in milligrammen.

Verdwijnen van Zetmeel bij verschillende Temperaturen. 77

Uit bovenstaande resultaten komen eenige feiten met duidelijkheid naar voren:

1. De gedroogde bladeren hebben een veel hoger suikergehalte dan de anders behandelde; de uit zetmeel ontstane suiker is daarbij hoofdzakelijk *saccharose*.
2. De monosen komen in eenigszins belangrijke hoeveelheid ($\frac{1}{2}$ % van het drooggewicht) alleen bij $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C. voor den dag.
3. In de vochtig gehouden bladen, waarin verdere ontledingsprocessen (bladen vergeeld) optraden, was ook vrij veel *saccharose* aanwezig.

Het blijkt, dat bij deze lage temperaturen de ademhaling niet zoo sterk is geweest, dat de gevormde suikers werden verademd. Bij deze lage temperaturen is de verschuiving van het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker de oorzaak der zetmeelomzetting. We hebben hier precies hetzelfde proces, als MÜLLER—THURGAU (57, 58) bij het zoet worden der Aardappels bij lage temperaturen heeft beschreven.

Ook komt dit resultaat volkomen overeen met de resultaten bij den opbouw van zetmeel uit suikeroplossingen verkregen. Zagen we daar niet, dat glucose alleen eenigszins bestaanbaar is bij $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C. en dat het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker er in de richting van zetmeelaafbraak was verschoven (verloren gaan van de eigenschap om zetmeel op te bouwen).

Voorts wijzen wij er nog op, dat het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker voor uitdrogen uiterst gevoelig is. Een bijzonder geringe teruggang in het vochtgehalte vermeerdert reeds de suikerhoeveelheid. Hoe sterker de uitdroging voortschrijdt, hoe minder ook de andere processen in de cel plaats kunnen vinden, die deze suiker verbruiken (ademhaling, vorming van tannine, enz.) zoodat we bij 15 % vochtgehalte bijna 10 % van het drooggewicht als suiker terugvinden en hiervan meer dan 80 % in den vorm van rietsuiker!

Ook bij bladen van volwassen planten was dit effect bij 't indrogen te bereiken (heele plant uit den pot genomen en laten indrogen). Als voorbeeld vermeld ik:

	Vocht- gehalte	Totale suikers	Monose	Saccha- rose	Maltose
Voor de proef (4 uur's middags)	87.5 ⁰ / ₀	13 ⁰ / ₀₀	—	5 ⁰ / ₀₀	8 ⁰ / ₀₀
Na 1 dag droog aan plant..	83.3 ⁰ / ₀	20 ⁰ / ₀₀	3 ⁰ / ₀₀	16 ⁰ / ₀₀	—
Na 2 dagen droog aan plant	81.5 ⁰ / ₀	37 ⁰ / ₀₀	7 ⁰ / ₀₀	29 ⁰ / ₀₀	—
Na 1 dag droog los van plant	68.7 ⁰ / ₀	45 ⁰ / ₀₀	6 ⁰ / ₀₀	37 ⁰ / ₀₀	—

78 *Verdwijnen van Zetmeel bij verschillende Temperaturen.*

Zooals we reeds eerder zagen, bevatten de oudere bladen na belichting meer suiker dan de jonge Tabaksblaadjes. Overigens zien we ook hier de saccharificatie optreden afhankelijk van de uitdroging, zoowel bij bladen aan, als los van de plant.

Thans willen wij nagaan, wat bij hogere temperaturen van het zetmeel terug is te vinden. Daartoe laten we de resultaten bij 28° en 40° C. volgen voor jonge plantjes, welke dezelfde belichting hadden ontvangen. De resultaten waren:

TABEL 6.

	Vochtgehalte	In milligrammen per 1 Gram droge stof	
		Totale suikers (als monosen)	Hiervan Saccharose
28° Celsius donker.....			
Voorproef	92.7%	5	1
8 uur droog	90.3%	13	6
8 uur nat	93 %	1	1
18 uur droog ¹⁾	87.8%	6	—
18 uur nat	94.4%	5	—
18 uur aan plant	93.8%	4	—
3½ dag droog ¹⁾	73.9%	8	—
3½ dag nat ¹⁾	33.9%	2	—
40° Celsius donker			
8 uur droog ¹⁾	79.5%	3	1
8 uur nat	93.5%	3	—
18 uur droog ¹⁾	61.4%	8	—
18 uur nat ¹⁾	94 %	5	1

Alleen bij 8 uur droog en 28° C. vinden wij in de gedroogde bladen iets meer saccharose dan normaal. In alle andere bladen zijn waarschijnlijk door de hoge temperaturen de suikers vrijwel geheel door de ademhaling verbruikt. We bemerken dus een geheel afwijkend gedrag vergeleken bij de bladen, die bij de lage temperaturen hadden verwijld.

Samenvattend kunnen we zeggen, dat de zetmeelverdwijning in de bladen bij verschillende temperatuur geen maatstaf is voor den

¹⁾ Zetmeel reeds volledig verdwenen.

afvoer van de ontledingsproducten. Het proces der zetmeelomzetting hangt nauwer samen met de ademhaling, maar evenredigheid bestaat in dit opzicht bij de verschillende temperaturen niet. Dit komt, doordat de enzymen, welke het evenwicht zetmeel \rightleftharpoons suiker beheerschen op hun beurt op ongelijke wijze door de temperatuur worden beïnvloed. Reeds bij 10° C. treffen we meer suikers in het blad aan dan bij de hoogere temperaturen, omdat dan de opbouwfunctie het begint af te leggen tegenover de hydrolyse, terwijl bij 1½° C. van opbouw zelfs in 't geheel geen sprake meer is in het Tabaksblad, terwijl de afbraak ervan nog voortduurt. Zoodat bij deze temperaturen een suikervorming plaats heeft uit het zetmeel, ook zonder dat de suiker eerst door verademing behoeft te worden verbruikt.

Over den invloed der temperatuur op de ademhaling in bladen van den Aardappel verscheen juist een onderzoek van LUNDEGÅRDH (45), Hij vindt:

Temperatuur: 0—10—20—30—40—50

Q_{10} 3,3 1,9 2,1 2,1 1,9

waarbij bovendien wordt opgemerkt, dat van een schadelijke werking zelfs na eenige uren inwerking van 40° C. nog niets te bespeuren valt.

Van 10° tot 40° C. vindt LUNDEGÅRDH dus een Temperatuurquotient, dat van dezelfde grootte is, als het door mij gevonden Temperatuurquotient voor de verdwijning van zetmeel uit het blad,

Tusschen 0° en 10° C. is de Q_{10} voor de ademhaling echter veel grooter dan voor de verdwijning van zetmeel. Deze laatste heeft zich dan door het onwerkzaam worden van het zetmeel-synthetiseerende ferment, onafhankelijk gemaakt van de ademhaling. En daar de versuikering van zetmeel in het blad door die lage temperaturen minder sterk wordt geremd dan de ademhaling, resulteert de suikertoe name, zooals die bij mijn bladen, verder in aardappels en in andere organen (boomen) voor den dag treedt.

IX. DE VERSNELDE OMZETTING VAN ZETMEEL BIJ UITDROGEN EN ANDERE VERSCHIJNSELEN, WELKE HIERMEDE VERBAND HOUDEN.

In het vorige hoofdstuk hebben we gezien, dat een geringe uitdroging van afgesneden bladen van Tabak reeds voldoende is, om de omzetting van het zetmeel te versnellen, terwijl bij lagere temperaturen, als niet direct de gevormde suiker aan de ademhaling ten prooi valt, dit zetmeel terugkeert voornamelijk in den vorm van saccharose. Op fig. 7 ziet men bladen, welke nadat ze flink geassimileerd hadden, eenigen tijd bij 28° C. afgesneden in 't donker hadden gestaan, de linkerhelften alle in een atmosfeer verzadigd met waterdamp, de rechterhelften droger (ongev. 70 % vochtigheid). Na 12 uur was het resultaat, zooals op de foto te zien is, dat het zetmeel in de droger staande bladen reeds verder was omgezet, dan in de helften, welke in een met waterdamp verzadigde atmosfeer stonden.

Herhaald werd deze proef aan een groote bloeiende Tabaksplant. Op foto 8 ziet men twee bladen, waarvan de linkerhelften (II) aan de plant bleven, de helft I droog en de rechterhelft III vochtig los van den plant bij 28° C. in 't donker werden bewaard. Na 18 uur was de droog gehouden helft, los van de plant reeds lang zijn zetmeel kwijt. De vochtig gehouden helft aan de plant bevatte nog wat zetmeel direct langs de hoofdnerf, en de vochtig gehouden helft los van de plant was licht grijs en zou in een uur of 4 in hetzelfde stadium zijn gekomen als het deel aan de plant. Het droog gehouden deel, hoewel van afvoer geen sprake kon wezen, had dus zijn zetmeel het snelst omgezet.

Wij komen dus tot de conclusie: *uitdrogen van met zetmeel gevulde bladen versnelt de zetmeelomzetting; het zetmeel keert, indien het niet geheel verademd kan worden, terug als saccharose.*

Bij studie der litteratuur vindt men bij RYWOSCH (70, 71) voor 't eerst de opmerking, dat droog gehouden bladen eerder hun zet-

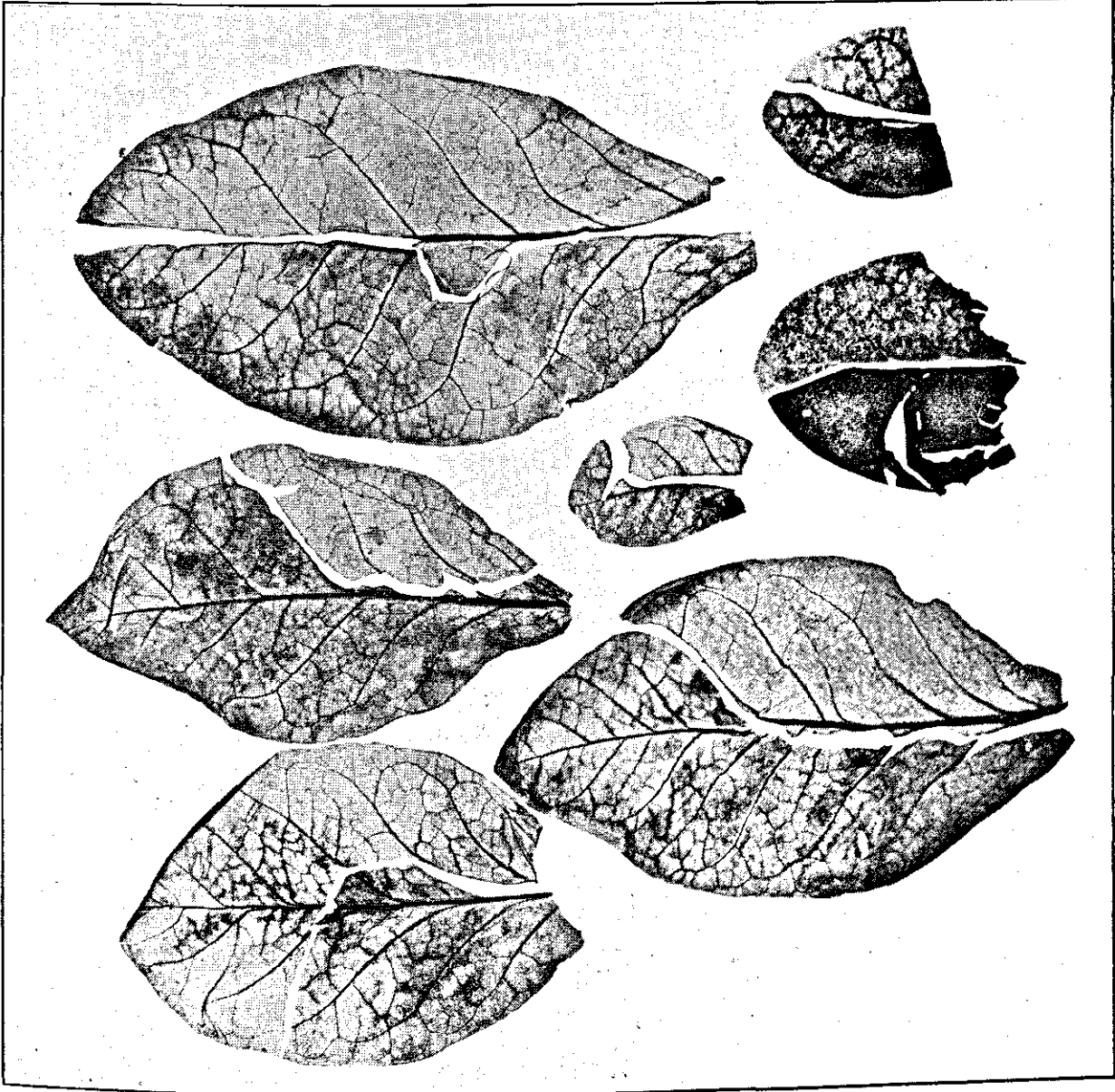


FIG. 7

Tabaksbladen, die voor de proef vol zetmeel waren, werden gehalveerd en bij 28° C. in donker gebracht, de linkerhelften in lucht verzadigd met waterdamp, de rechterhelften droog. Het resultaat na 12 uur.

Von Tabaksblättern, vor dem Versuche Stärkereich, wurden die linken Hälften in mit Wasser gesättigter Luft, die rechten Hälften in trockner Luft gebracht bei 28° C. im Dunkeln. Das Resultat nach 12 Stunden.

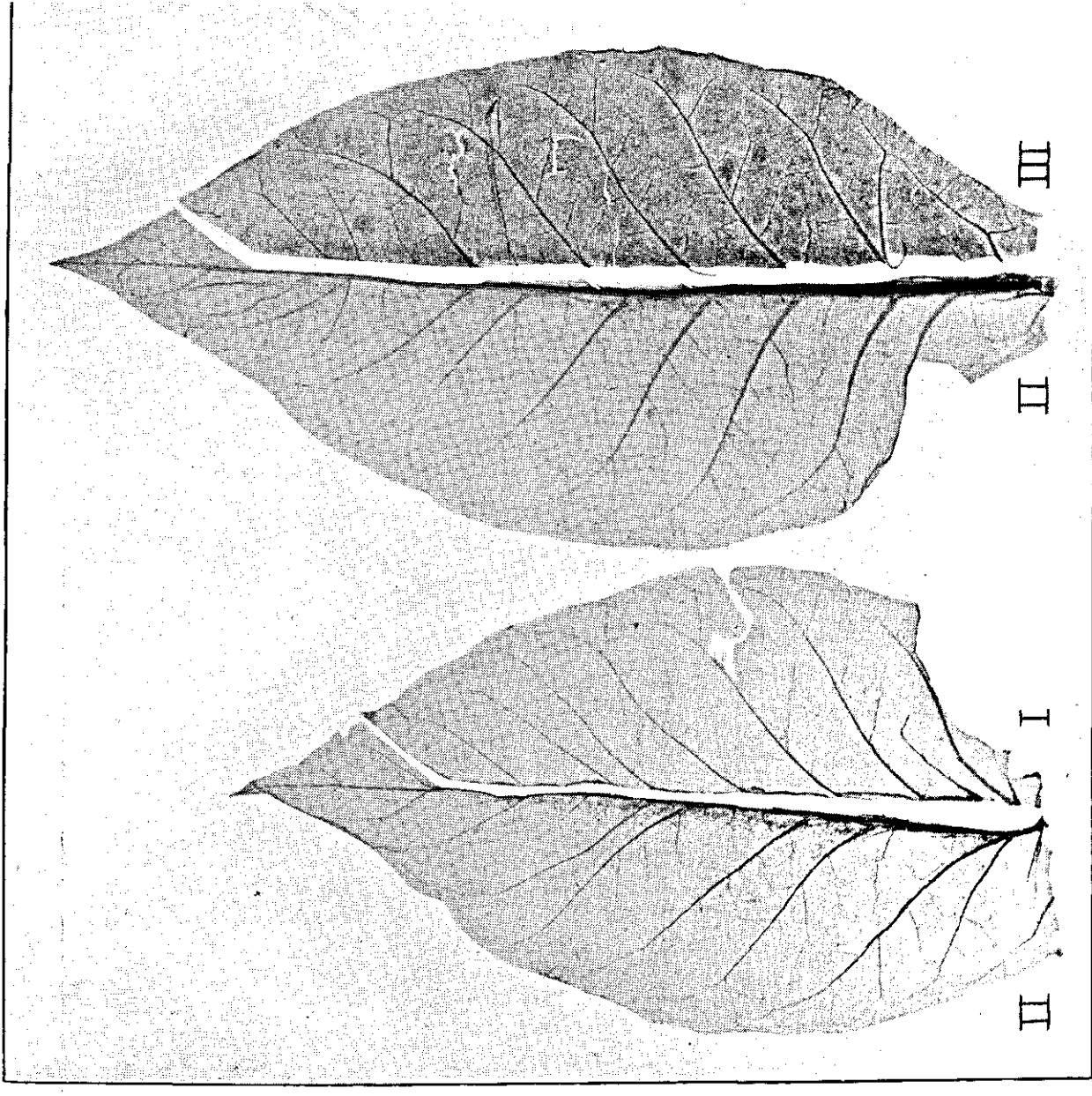
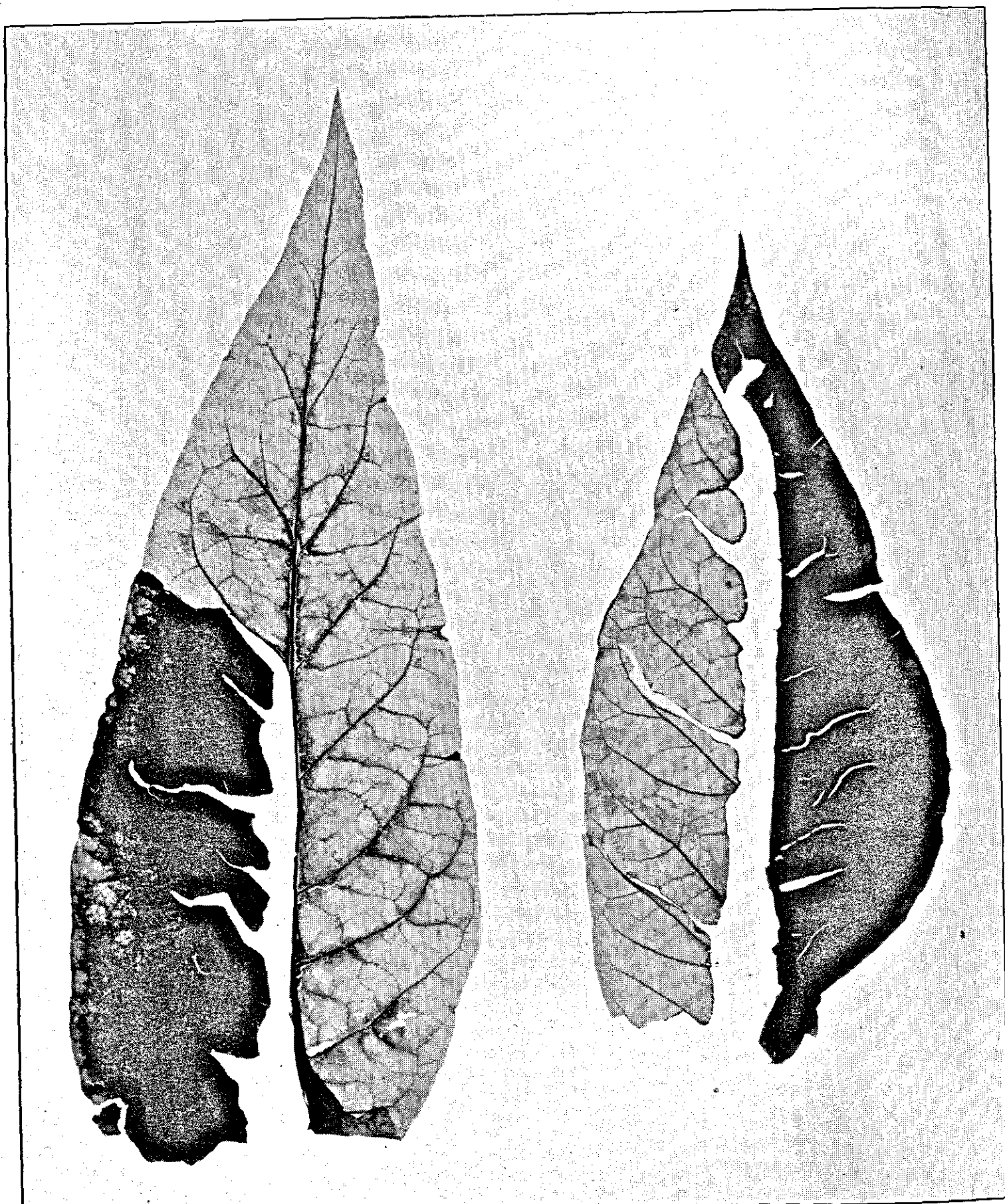


FIG. 8

Middenbladen van een groote Tabaksplant na 18 uur bij 28° C. in donker, zóó dat I droog, los van de plant, II in vochtige lucht vrij van de plant, III vochtig aan de plant.

Mittenblätter einer Tabakspflanze nach 18 Stunden in 28° C. im Dunkeln wobei I trocken, abgeschnitten; II in feuchter Luft, abgeschnitten; III feucht, an der Pflanze.



A₁

B₁

B₂

A₂

FIG. 9

Deze bladen bleven 42 uur in donker bij 28° C. en lagen vervolgens op 8 % glucose gedurende 1 dag. De helften A werden gedurende deze 42 uur vochtig bewaard, de helften B echter 18 uur droog gehouden (B₂ droger dan B₁), maar daarna op water gelegd, totdat de normale turgor weer bereikt was.

Tabaksblättern, welche während 42 Stunden in 28° C. im Dunkeln standen und dann während 24 Stunden auf 8 % Glukose lagen. Die Hälften A waren während diesen 42 Stunden feucht aufbewahrt. Die Hälften B wurden während 18 Stunden einer Trocknung ausgesetzt, dann aber auf Wasser gelegt, bis der Wassergehalt wieder normal war und die Blätter wieder frisch aussahen. Die Hälfte B₂ war einer grösseren Austrocknung ausgesetzt als B₁.

meel verliezen, dan vochtig gehouden bladen. Hij zag het bij *Impatiens sultani* en bij *Polemonium coeruleum*. Zoo „voerden” droog gehouden bladen van de laatste plant het zetmeel in droge atmosfeer in 15 uur volledig „af”, in vochtige atmosfeer eerst in 36 uur, zegt hij. De oorzaak van de zetmeelverdwijning zag RYWOSCH in den *afvoer*, omdat hij verkeerdelijk zetmeelverdwijning met afvoer combineerde. Hij meende, dat uitdrogen versterkte transpiratie, en daardoor een grooter diffusieveral schiep. „So müsste ein energischer Wasserstrom eine bessere und schnellere Ableitung der Stoffe aus den grünen Zellen, als ein schwacher Strom nach sich ziehen”, zegt R. Daar het verschijnsel ook zeer duidelijk in afgesneden bladen optreedt, was deze verklaring reeds weinig aannemelijk. Ik voerde echter nog de volgende proef uit. Aan een groote Tabaksplant werden twee middenbladen van hun eene bladhelte beroofd en droog bewaard. Eén der aan de plant gebleven helften hield ik aan de plant in vochtige atmosfeer. De andere bladhelte aan de plant werd door den hals van een groote Erlemeyer, welke voor een deel met ongebluschte kalk gevuld was, gestoken en de Erlemeyerinhoud met watten van de vochtige buitenlucht afgesloten. De pot, waarin de plant stond werd zeer vochtig gehouden; deze bleef nu bij 28° C. in 't donker, bij welke temperatuur ook de afgesneden bladen lagen.

Het blad aan de plant in de droge atmosfeer van den Erlemeyer verdampte sterk, maar vulde zijn watergehalte uit den hoofdstengel aan, zóó zelfs, dat na een halven dag, toen de bladen op hun zetmeelgehalte onderzocht werden, dit blad verzadigd met water was, druppels op de oppervlakte afscheidde, en het vochtgehalte van dit blad grooter was, dan het blad, dat in vochtige atmosfeer aan de plant had gestaan. Volgens RYWOSCH zou dit blad dus in de gunstigste conditie zijn geweest voor zetmeelafvoer. Het bleek echter, dat de droog gehouden afgesneden bladen na eenigen tijd hun zetmeel kwijt waren, terwijl beide aan de plant gebleven bladen rijkelijk en evenveel zetmeel bevatten. *De door uitdroging veroorzaakte versterkte transpiratie is dus niet de oorzaak der versterkte zetmeelomzetting, doch de uitdroging van het blad zelf is de oorzaak van het verschijnsel.* Dit werd nog bewezen door bladen aan de plant te laten indrogen, door *niet* voor voldoende wateraanvoer te zorgen (de planten werden b.v. met een kluit uit den pot genomen). Als verwelken intrad, was na eenige uren het zetmeel eruit verdwenen, waarvoor vochtig gehouden bladen, los van de plant veel meer tijd eischten.

Wij vinden verder een interessant onderzoek van LUNDE-

GÅRDH, die waarnam, dat wateronttrekking bij Homalia, Mnium en eenige andere mossen de zetmeelomzetting bespoedigde. Een verklaring ervoor heeft L. niet aangegeven. Hij zegt: „Merkwürdig muss es vor allem erscheinen, dass die Stärke verschwindet, obwohl der Zellsaft konzentrierter wird“. En hij voegt er aan toe: „Entweder muss also beim Eintrocknen die innere Zuckerkonzentration nicht erhöht werden, oder es handelt sich um einen komplizierten Regulationsvorgang“. Zooals we zagen treedt bij Tabaksbladen, als niet alles verademd wordt, bij indrogen meer suiker op, zoodat de heele kwestie ook werkelijk niet zoo eenvoudig is. In 1921 zag MOLISCH (54) bij Tropaeolum, Boehmia utilis en eenige andere planten, zetmeel bij indrogen verdwijnen. Verwelkende bladen verloren in 10 uur hun zetmeel, waarvoor bladen aan de plant 60 uur noodig hadden. Bij deze indrogende bladen zag hij het suikergehalte niet toenemen, maar ook hij vermeldt weer niets over de temperatuur, zoodat wij over de verademing geen oordeel kunnen uitspreken.

In een onderzoek door FRL. HORN onder leiding van SCHROEDER uitgevoerd met Tropaeolumbladen, komt HORN (82) aan de hand van bepalingen van het saccharose-, maltose- en monose-gehalte en zetmeelbepaling met behulp der Iodiumproef, in een groote reeks van proeven, telkens weer tot het resultaat, dat bij indrogen der bladen het zetmeel sneller wordt omgezet en in den vorm van saccharose terugkeert.

Het is jammer, dat nergens eenige aanwijzing wordt gegeven over de temperatuur, waarbij wordt gewerkt. Samenvattend zegt HORN (33): „Im welkenden Blatt von Tropaeolum majus tritt, in ursächlichem Zusammenhang mit der Abnahme des Wassergehaltes stehend, Schwinden der Stärke auf. Der Gesamtzuckergehalt steigt also, und zwar nimmt der Rohrzucker mit abnehmendem Wassergehalte stets zu“ en „Die Rohrzuckermenge ist eine Funktion des Wassergehaltes: mit steigendem Wassergehalt sinkt der Rohrzuckergehalt, mit fallendem Wassergehalt nimmt er zu“. Hetzelfde vond HORN bij Mnium-bladen en Syringa.

Zeer onlangs heeft AHRNS (1) het onderzoek onder leiding van SCHROEDER ook voor andere planten onderzocht, n.l. voor Phaseolus, Vitis, Helianthus en Pisum. Helaas wordt wederom over de temperatuur geen woord gezegd. Hij concludeert „Bei Gegenwart von Stärke steigt der Rohrzuckergehalt sowohl in verdunkelten als auch in belichteten detachierten Blättern bei fallendem und fällt bei steigendem Wassergehalt. Diese Rohrzucker-Zunahme vollzieht sich unabhängig vom Lichtzutritt, en muss also der Rohrzuckergehalt als eine Funktion des Wassergehaltes angesehen wer-

den, der gross ist bei geringem und klein bei hohem Wassergehalt".

En verder: „Diese für detachierte Blätter aufgestellten Regeln haben ebenfalls Giltigkeit für Blätter, die mit der Pflanze in Verbindung stehen, und sie können nach den an einer grösseren Anzahl Pflanzen gewonnen en Befunden als eine Erscheinung allgemeiner Verbreitung angesehen werden". Hoewel ook AHRNS de verklaring van dit typische verschijnsel niet verder heeft opgelost, zijn de door hem verkregen resultaten in zoo volmaakte overeenstemming met wat ik bij Tabak vond, dat deze onderzoeken voor mij van groote beteekenis zijn.

Het valt nu ook op, dat het uitblijven van zetmeelvorming in plasmolytische suiker-concentraties en het optreden hierbij van saccharose (zie pag. 53), als karakteristiek feit, niets anders is, dan het onttrekken van water aan de cellen, evenals dit door uitdrogen gebeurt. Het typische verschijnsel in de hooge plasmolytische concentraties wordt dus teruggevoerd tot dit meer algemeene feit: Wateronttrekking bevordert de zetmeelomzetting, saccharose treedt nu in zeer groote hoeveelheden voor den dag¹⁾, soms vergezeld van wat gesplitste monosen (zie plasmolyseproeven; zie ook AHRNS: 't Hexosengehalte bereikt in drooggehouden bladen meest een hoogere waarde, dan in vochtig gehouden bladen).

Alvorens de oorzaak van het verschijnsel verder te bestudeeren, moet ik nog wijzen op een recent onderzoek van ILJIN (37, 38). Deze onderzoeker hield zich bezig met de physiologie der huidmondjes. Hij ging ook na den invloed van het verwelken op het zetmeelgehalte der sluitcellen van *Ranunculus repens* en *Rumex confertus*. Hij merkt op: „Ich habe den Einfluss der Entwässerung auf das Verschwinden der Stärke an der Hand von zahlreichen Versuchen studiert, wobei sich stets ein und derselbe Effekt ergab, das nämlich der Wasserverlust die Arbeit des spaltenden Ferments begünstigt, die des synthetisierenden aber schädigte". Dit resultaat is opnieuw met het onze in overeenstemming. Bepaling van de suikers kon hij bij de huidmondjes niet uitvoeren. Hij meent echter, dat geen suikervermeerdering was opgetreden, omdat bij hernieuwde wateropname geen zetmeel terug ontstond. Hij veronderstelt daarom, dat uit het zetmeel door indrogen verbindingen zijn ontstaan, uit welke geen zetmeel kan worden opgebouwd. („Bilden sich Substanzen anderer Art, die den Turgor nicht steigern, sich auch nicht in Stärke zurückverwandeln können").

¹⁾ Indien de ademhaling niet te sterk is.

Dit niet omkeerbaar zijn van het verschijnsel vond ik ook bij Tabak, en zoowel HORN als AHRNS gelukte het niet bladen, die weer water opnamen, zetmeel uit de saccharose te laten opbouwen. In zooverre stemt dit verschijnsel met alle onze feiten overeen, en dus is het geheel niet noodig, dat bij ILJIN verbindingen zijn gevormd, waaruit bij normale voorwaarden geen zetmeel zou zijn ontstaan.

Er blijkt uit, dat het verschijnsel niet als een eenvoudig chemisch evenwicht opgevat kan worden, en het lag daarom voor de hand te onderzoeken, of het enzymatisch evenwicht wellicht verschoven was. Daartoe werden bladen in de proefomstandigheden afgesneden, gehalveerd en één deel der bladhelften nog een dag in vochtige omstandigheden bij 28° C. bewaard. De andere helften werden 16 uur aan meer of minder sterke uitdroging blootgesteld. Vervolgens werden deze bladen 8 uur op water gelegd, zoodat zij hun turgór herkregen. Daarna kwamen beide bladreeksen te liggen in 16 % saccharose bij 28° C. gedurende één dag, waarna de zetmeelvorming met de Iodiumproef werd onderzocht.

Beide bladreeksen hadden dus dezelfde voorbehandeling ondergaan, alleen had de ééne reeks 16 uur aan uitdroging blootgestaan, terwijl de andere reeks gedurende dien tijd vochtig was gehouden. Er bleek nu een zeer groot verschil in zetmeelvormend vermogen te bestaan. De bladhelften welke steeds vochtig hadden gestaan hadden in de gunstige suiker-concentratie en temperatuur zeer veel zetmeel gevormd. De bladhelften welke een tijd aan droogte hadden bloot gestaan, vormden des te minder zetmeel, naar gelang ze sterker waren uitgedroogd. Reeds bij een matige uitdroging trad niet de minste zetmeelvorming op. Wij kunnen zeggen, dat de bladen door de uitdroging de eigenschap tot zetmeelvorming hadden verloren, terwijl de eigenschap tot zetmeelhydrolyse was behouden gebleven; of m.a.w. *bij het uitdrogen der bladen treedt zeer spoedig afsterven van het zetmeelopbouwende enzym op, het hydrolyseerende enzym is voor uitdrogen minder gevoelig.*

Dit belangrijke resultaat werd nog bevestigd door waarnemingen aan de bladen zelf. Het langste bleef het zetmeelvormend vermogen langs de hoofdnerf en grootere zijnerfen behouden, m.a.w. *in de buurt waar het waterverlies moeilijker tot stand te brengen is.* De nerven houden hun water n.l. veel makkelijker vast, dan de rest van het bladweefsel. In fig. 9 is dit resultaat b.v. duidelijk waarneembaar. Bladhelften A₁ en A₂ zijn vóór het plaatsen in de 16 % saccharose-oplossing steeds vochtig gehouden; de helften B₁ en B₂ hebben beide 16 uur droog gestaan, en wel B₂ droger dan B₁. Beide laatsten had-

den echter door hernieuwde wateropname voor ze in de suikeroplossing kwamen hun volledige turgor weder bereikt.

Het is nu ook begrijpelijk, dat het noch ILJIN, noch AHRNS gelukte zetmeelvorming uit de uit zetmeel ontstane saccharose te bewerken bij hernieuwde wateropname, want door het uitdrogen was de zetmeelopbouwende eigenschap verloren gegaan. Intusschen bleek, dat na eenige dagen verblijf onder vochtige en normale omstandigheden deze eigenschap wordt geregenereerd. De snelheid der eventueele regeneratie bepaalt of al of niet reversibel worden der reactie waar te nemen is.

Het verschijnsel heeft eenige overeenkomst met den invloed van lage temperatuur. Ook daar was de functie tot zetmeelopbouw verloren gegaan, de hydrolyse vond echter ook bij deze temperatuur nog voortgang. Bij overbrengen in hoogere temperatuur herstelde zich de eigenschap tot zetmeelopbouw echter veel sneller, dan bij uitdrogen, hetgeen echter slechts een kwantitatief verschil is.

Bij studie van het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker in aardappels vond WATERMAN (94, 95, 96), dat bij overschrijden van een bepaalde temperatuur ($\pm 35^{\circ}$ C.) plotseling belangrijke hoeveelheden suiker, vnl. saccharose in den Aardappel optraden. Evenals bij de lage temperaturen werden de aardappels „zoet”. Bij al te hoge temperaturen (100° C.) was ook de afbraak, door algeheele afsterving der celfuncties, geëindigd en veranderde het koolhydraatgehalte dus niet.

Voor Zeeuwsche Blauwen geeft hij bij droging de volgende uitkomsten:

	Niet gedroogd	Gedroogd bij 40° C.	Gedroogd bij 105° C.
Voorinversiered. Suiker (berekend als glucose).	0.25 %	0.2 %	0.05 %
Saccharose	0.2 %	3.2 %	0.2 %
Zetmeel	niet bepaald	14.4 %	17 %

En een andere proef met „Bravo's”:

Droging bij	35°	45°	55°	105°
Saccharosegehalte	3.3 %	2.1 %	1.6 %	0.4 %

Deze saccharosehoeveelheden werden in 1—2 dagen gevormd. Telkens bleek alleen saccharose aanwezig te zijn en practisch geen

invertsuiker. Bij temperaturen tusschen 35° en 55° C., een overgangsgebied voor de levensprocessen, treedt opnieuw de saccharificatie van zetmeel als typisch verschijnsel op. Bij 100° C., als heelemaal geen enzymatische processen meer kunnen plaats hebben, wordt het oorspronkelijk suiker- en zetmeelgehalte terug gevonden.

Bij de hoge temperaturen door WATERMAN toegepast, is het alweer de zetmeelsynthese, welke het eerst wordt geremd, de hydrolyseerende enzymen zijn resistenter. Ook bij naderen van het vriespunt worden eerst de opbouwende enzymen aangetast, na 't overschrijden van 't vriespunt (bevriezen der bladen) pas de hydrolyseerende fermenten onwerkzaam. En wanneer we bladen drogen, wordt direct de synthese schadelijk beïnvloed, de hydrolyse eerst bij langer of sneller indrogen gestopt. *Bij het naderen der levensgrenzen is 't de opbouwreactie, die als endotherm proces het gevoeligste is; de hydrolyseerende functie, als proces, waarbij warmte vrij komt, sterft eerst later af.*

Dat een exotherme reactie geringere eischen aan de omstandigheden stelt, verdere uitersten kan trotseeren, dan de meer subtiële opbouw, lijkt mij zeer plausibel. En zulks blijkt b.v. ook uit het feit, dat buiten de plant wel hydrolyse, maar geen synthese van zetmeel kan plaats vinden, alweer omdat opbouwen hogere eischen aan de omstandigheden stelt dan afbreken. Aan de levensgrenzen van de plant is dus een gebied of een tijdsperiode, waarin het zetmeel in den vorm van saccharose voor den dag komt, zonder dat het weer wordt opgebouwd. *In dit overgangsgebied tusschen leven en dood is het koolhydratenevenwicht in de richting van saccharose geheel eenzijdig verschoven, zonder dat de desorganisatie van de plantenstructuur echter reeds zoover is voortgeschreden, dat ontleding der suiker intreedt.*

Dit verschijnsel is in staat meerdere feiten, welke ons uit de koolhydraatverhoudingen in eenige planten bekend zijn, te verklaren.

In de eerste plaats wijs ik op het suikerriet, *Saccharum officinarum*. De rijpingsperiode van het riet is voor het grootste deel van de plant fysiologisch beschouwd niets anders dan een overgang tusschen leven en dood. Nu is ons b.v. door het onderzoek van WENT (99) bekend, dat het saccharosegehalte vnl. in de oudere stengeldeelen gedurende de rijpingsperiode stijgt, terwijl in de jongere nog groeiende toporganen dan weinig of geen saccharose voorkomt. Als voorbeeld haal ik aan: Bijna rijp riet bevatte (in % van het internodiumgewicht uitgedrukt) op 30 Juni:

	Reduceerende suiker	Saccharose
Internodium nr. 1 (onderste) ..	0.55	8.2
„ nr. 11	0.4	13.0
„ nr. 21	0.2	16.9
„ nr. 31, 32	0.32	13.5
„ nr. 41—46	1.1	5.0
(jongste deel, groeiende vegetatiepunt)		

Laat men, zegt WENT „rijp” riet nu nog langer op het veld staan, dan vermeerdert ook in de dan afstervende jongste deelen het saccharosegehalte nog, maar in de oudere stengeldeelen begint het snel te dalen, en treden als verdere afbrekingsproduct monosen op. Dit is, zegt WENT, een afstervingsproces; eigenlijk moeten we zeggen een verdere ontleding en afsterving der levensfuncties, dan het „rijpe” stadium voorstelt, dat de practijk wenscht.

Ook ziet WENT in den *drogen* tijd de saccharose in de plant sterk vermeerderen, hetgeen een nieuwe analogie is.

Een ander dergelijk verschijnsel vinden wij bij het rijpen van vruchten terug.

Vruchten verliezen door het rijpen hun wrange smaak, wat o.a. komt door de omzetting van zetmeel tot suiker. Door afplukken versnelt men de afsterving en daarmede wederom de versuikering van het zetmeel. PRINSEN GEERLIGS (65) constateerde na het afplukken van Pisangs (*Musa*) een snelle omzetting van het zetmeel, hetwelk wederom in den vorm van saccharose terugkeert. Ik haal uit zijn resultaten het volgende voorbeeld aan:

20 Pisangvruchten werden groen afgebroken en dagelijks onderzocht:

Datum van onderzoek	April: 17	19	20	22	23	24
Staat van rijpheid	Onrijp, schil laat niet los	Onr., schil laat los	begint te rijpen	bijna rijp	rijp	over-rijp
Analyse van het vrucht-vleesch (% v. het versch-gewicht):						
Monosen						
(glucose + fructose)	0.25	1.86	3.23	5.88	8.33	10.9
Saccharose	0.86	4.43	6.53	10.50	13.68	10.36
Zetmeel	30.98	24.98	20.52	13.89	9.59	7.68

Zoo mogelijk nog duidelijker komt de saccharificatie van het zetmeel uit bij de groen geplukte Manggavruchten (*Mangifera*):

Datum van onderzoek	29 Sept.	1 October	2 October	4 October
Saccharose	2.57	10.50	12.27	9.31
Monosen (glucose + fructose)	2.50	3.63	3.31	4.70
Zetmeel	8.53	0.55	0	0

Zeer duidelijk treedt ook hier de saccharificatie van het zetmeel naar voren, gedurende de eerste afstervingsprocessen.

Het is mogelijk, dat door hoog zuurgehalte of hoog gehalte aan invertase de saccharose, welke uit het zetmeel ontstaat ook in de levende cel reeds niet bestaanbaar is, zoodat het zetmeel bij omzetting direct in den vorm van monosen terugkeert. Iets dergelijks zien we bij de uitkomsten van PRINSEN GEERLIGS over het rijpen der Tamarindevruchten.

Een andere illustratie van het hier behandelde verschijnsel vinden wij bij LUNDEGÅRDH voor zaden, wanneer deze aan droging worden blootgesteld. Bij de olie-houdende zaden van *Helianthus*, *Cucurbita*, *Cucumis*, *Brassica napus* en *Trifolium incarnatum* bemerkte L., dat het opzwellen der rijpe zaden een sterke vorming van zetmeel ten gevolge had, het indrogen deed de olie wederom terugkeeren ten koste van het zetmeel. Wanneer wij aannemen, dat in deze zaden een soort (enzymatisch) evenwicht bestaat, dat men als volgt kan schematiseeren: zetmeel \rightleftharpoons saccharose \rightleftharpoons olie, dan begrijpt men, dat bij indrogen 't zetmeel, naar wat wij nu weten in saccharose zal worden overgevoerd, waardoor dan de olie toeneemt. Accepteert men bovendien, dat in deze zaden de zetmeel-synthetiseerende functie, wat spoediger geregenereerd wordt dan in het blad, zoo is ook de omkeerbaarheid der reactie te begrijpen. LUNDEGÅRDH zegt dan ook: „Es scheint also, als ob das physiologische Gleichgewicht: Öl \rightleftharpoons Stärke vom Wassergehalt in den Zellen bedingt werden könnte”.

Het was ook LUNDEGÅRDH (46), die veronderstelde, dat als tussenproduct suiker zou optreden, en dit leidde hem ertoe om eens na te gaan, of in andere niet-oliehoudende zaden wellicht door droging een dergelijken invloed op het systeem zetmeel \rightleftharpoons suiker ware uit te oefenen; daaruit zou dan blijken, of het dit onderdeel der reactie is, dat meer speciaal voor de wateronttrekking gevoelig is.

Daartoe werkte hij met zaden van *Triticum*, *Avena* en *Zea*. Opgezwollen kiemende zaden bevatten direct in het embryo zeer veel zetmeel. Bij drogen worden de zetmeelkorreltjes snel kleiner, en

is het zetmeelgehalte er evenals in droge rijpe zaden uiterst gering. „Die Versuche lehren, dass in den untersuchten Fällen auch das System Stärke \rightleftharpoons Zucker gegen Wasser empfindlich ist, in dem Sinne, dass Trockenheit das Auflösen der Stärke begünstigt.” Zonder twijfel hebben wij ook bij de omzettingen der koolhydraten in drogende en kiemende zaden een speciaal geval te zien van het hier bestudeerde verschijnsel, dat een zeer groote verbreiding schijnt te bezitten en van buitengewone beteekenis voor het leven van de plant is.

Nog een oogenblik keeren wij naar onze bladen terug. De bladen met hun groote oppervlakte en geringe dikte zijn zeer gevoelig voor uitdrogen, ontzettend veel gevoeliger, dan de van de omstandigheden afgesloten zaden. Gezien voorts de buitengewone gevoeligheid der zetmeel-synthetiseerende enzymen, moet bij het blad ook onder natuurlijke omstandigheden dit verschijnsel het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker dikwijls verschuiven: een plotselinge bezonning, een droge wind, een in den zomer veel voorkomende hooge bladtemperatuur, deze alle belemmeren de zetmeelvorming. Het ligt voor de hand, dat we het niet voorkomen van zetmeel in de Tropaeolumbladen van SACHS 's middags bij 33° C. aldus moeten verklaren. Voorts, dat de z.g. „solarisatie” van URSPRUNG (88) niets anders is dan een langzame uitdroging onder invloed der sterke bestraling. Wanneer wij bij BROWN en MORRIS (10) vinden, dat 's middags door assimilatie vooral de saccharose is toegenomen, wordt het overwogen van dezen suiker hoogstwaarschijnlijk door een geringe uitdroging van het blad veroorzaakt. Hetzelfde oordeel heeft ook HORN (33) over deze uitkomsten van BROWN en MORRIS uitgesproken. Nog duidelijker, zegt HORN kan men het verschijnsel in de uitkomsten van GIRARD terugvinden:

Oogsttijd	24 Sept., 4 uur, p.m.	26 Sept., 4 uur a.m.	26 Sept., 4 uur, p.m.
Watergehalte	86,24	87,62	85,15
<i>Saccharose</i>			
<i>Reduc. Suiker</i>	33	22	68

Doordat men den invloed van dit verschijnsel toen nog niet kende, kwamen BROWN en MORRIS er toe deze saccharose als direct (eerste) assimilatieproduct aan te zien.

Er is echter meer. Het geringer zetmeelgehalte van assimileerende afgesneden bladen moet zonder twijfel ook in verschuiving der

enzymwerkzaamheid door de uitdroging worden gezocht. In fig. 2 ziet men hieromtrent eenige van mijn proeven met Tabak. De afgesneden bladen bevatten na 11 uur belichting (door niet te voorkomen matige uitdroging) minder zetmeel dan die aan de plant, waar het waterverlies geregeld aangevuld kon worden. De verdeling van het zetmeel in het afgesneden blad, (veel bevindt zich direct boven de plaats, waar het blad in water reikte en langs de minder snel uitdrogende hoofdnerf) laat geen twijfel over, dat deze conclusie juist is. Na 3 dagen belichting is aan de plant het zetmeelgehalte nog toegenomen, in het afgesneden blad echter nog teruggegaan (vgl. de „solarisatie” van URSPRUNG).

Ook de verdeling van het zetmeel in het blad wordt door de uitdrogende invloed op het evenwicht suiker \rightleftharpoons zetmeel voor een groot deel bepaald.

De hoofdnerf en grootere nerven verliezen bij uitdrogen lang zoo snel hun water niet als de gewone parenchymatische cellen. Het evenwicht: zetmeel \rightleftharpoons suiker is dus in de nerven en in de omgeving ervan bevoordeeld ten opzichte van den zetmeelopbouw vergeleken bij het overige bladweefsel of m.a.w. de synthetiseerende kracht der leukoplasten zal er grooter zijn. Dit is, wat ik ook steeds weer vond voor de schorsparenchymcellen. In het palissadenweefsel zagen we het laatst het zetmeel verdwijnen langs de hoofdnerf, omdat ook dit weefsel reeds minder door de diverse uitdrogende invloeden geschaad wordt door de nabijheid der nerven; een kwestie alweer van watertoevoer. En niet zooals SCHIMPER (78) meende van koolhydratenafvoer.

Met deze voorbeelden meen ik duidelijk genoeg te hebben aangetoond van welke groote beteekenis dit verschijnsel is voor de koolhydraatomzettingen in de plant.

Een enkel woord over de rol of beteekenis van de koolhydraten in het Tabaksblad. We vonden, dat de koolhydraten geen transportfunctie vervullen, en dat het *zetmeel* kan worden beschouwd, als reservebron van energiemateriaal voor de cel. *Saccharose* zagen we als typisch afbrekingsproduct van zetmeel optreden. Het voorkomen er van (lage temperaturen, uitdroging) beteekende geen gunstige groeivoorwaarden voor de plant. *Maltose* is misschien het tusschenproduct in den opbouw tot zetmeel (kwam bij de bladen in suikeroplossingen bij $1\frac{1}{2}^{\circ}\text{C.}$, waar geen zetmeel werd gevormd, niet voor). De *monosen* (door ons niet gescheiden) zijn als het eerste assimilatieproduct aan te zien. Onder omstandigheden gunstig voor den groei (synthese van allerlei organische verbindingen,

waartoe zij de bouwsteenē leveren) worden ze echter direct bij de vorming verbruikt. Overweegt de zetmeelafbraak onder ongunstige groei-omstandigheden, dan kunnen zij als splitsingsproduct naast saccharose toenemen.

Het is de moeite waard, om de aandacht er op te vestigen, dat buiten de cel met bladaftreksel of bladpoeder (diastase) *nooit* saccharose doch steeds maltose als disaccharide-afbrekingsproduct en tussenproduct bij de hydrolyse van zetmeel optreedt. *In* de plant is saccharose als splitsingsproduct van zetmeel met zekerheid waargenomen en maltose juist als opbouwproduct tot zetmeel met eenige waarschijnlijkheid geconstateerd. Dit is een aanwijzing voor ons, hoe voorzichtig wij moeten zijn met conclusies over de gebeurtenissen *in* de plantencel uit de diastatische werking van de op één of andere wijze *buiten* de plant gekregen enzymen. Dit zelfde dringt zich bij ons op, wanneer wij zien, dat het bladpoeder zonder zuurstof zetmeel kan omzetten, terwijl in de cellen van hetzelfde blad deze hydrolyse zonder zuurstof niet kan plaats vinden.

XI. DE OPHOOPING VAN ZETMEEL IN BLADEN VAN MOZAIEKZIEKE TABAK, BLADROLZIEKE AARDAPPELS EN ANDERE VIRUSZIEKE PLANTEN.

Een van de meest typische stoornissen, welke de mozaiekziekte in de stofwisseling van de Tabaksplant te voorschijn roept, is de verminderde omzetting van het zetmeel in de zieke plekken van het blad. Zoo merkt HUNGER (36) op: „dass ungeachtet der günstigen Nachttemperatur, wenn die weitere Blattspreite vollkommen frei von Stärke wird, die Abführung der Assimilationsprodukte aus den hell gefärbten Blattteilen so äusserst gering ist, dass immer ein grosser Rest zurück bleibt”. Hetzelfde ziet ook WOODS (102). Door de welwillendheid van Prof. QUANJER kwam ik in het bezit van eenige sterk mozaiekzieke Tabaksplanten, waarbij de waarneming van bovengenoemde onderzoekers makkelijk was te bevestigen. De omzetting van het zetmeel schreed uiterst langzaam voort in de bladen mijner heel sterk mozaiekzieke planten. Het is echter onjuist deze storing in de zetmeelomzetting als een storing in de „Abführung”, „Ableitung”, „Translocation”, enz te zoeken, zooals door de phytopathologen gedaan is, omdat in zijn klassieke werk over de bladphysiologie SACHS zetmeelomzetting en afvoer als hetzelfde had beschouwd.

In het voorgaande hebben we geleerd, dat de zetmeelverdwijning in het Tabaksblad voor een groot deel neerkomt op een verademing ervan.

Hieruit volgt, dat we bij niet-omzetten van het zetmeel dit niet mogen zoeken in een storing van de koolhydratenafvoer, maar in een storing van de ademhaling, of van het enzymatisch evenwicht zetmeel \rightleftharpoons suiker in de richting van afbraak.

We kunnen ons de volgende mogelijkheden denken: 1e. het „virus” heeft een zeer schadelijke werking op de ademhaling(enzymen), waardoor geen of weinig suiker wordt verademd en de zetmeelhydrolyse geen verderen voortgang vindt; 2e. in het enzymatisch be-

heerschte evenwicht suiker \rightleftharpoons zetmeel remt het virus de diastatische werkzaamheid, òf het versnelt den opbouw.

Hiermede is een richting van onderzoek aangegeven.

Het is de moeite waard er op te wijzen, dat COLEMAN (13) bij een overeenkomstige ziekte van den Sandelboom bij mozaiekzieke bladen de diastatische werkzaamheid geringer vond, dan van een gelijke hoeveelheid gedroogde gezonde bladen. Ik wil er hierbij echter vooruit de aandacht op vestigen, dat toch dergelijke uitkomsten heel weinig zeggen over het feit, of het evenwicht zetmeel \rightleftharpoons suiker verschoven is. Als we b.v. dit evenwicht willen vergelijken bij licht en donker (zooals BROWN en MORRIS) of bij zieke en gezonde bladen, zegt de diastatische werking van gedroogde bladen ons niet veel. Al vonden wij in een bepaald geval een groo-tere diastatische werkzaamheid van het bladpoeder, we weten niet of daarnaast óók niet de *opbouw*enzymen in hun werkzaamheid waren versterkt. Er zijn immers 2 reactiereeksen, welke door en-zy-men worden beheerscht, zoodat de veranderde werkzaamheid van één reeks nog niets zegt over een verschuiving van het totale evenwicht. Bovendien is de diastatische werkzaamheid van blad-poe-der maar een afspiegeling van wat dat enzym *in* de plant doet. Het was reeds aan BROWN en MORRIS duidelijk, dat men een heel andere diastatische werkzaamheid waarneemt van waterig blad-extract, dan van alcoholisch bladextract. De diastatische werking van het bladpoeder vonden zij weder geheel anders te zijn. Ze zeggen: door het drogen wordt de diastase van het „plasma” los gemaakt, terwijl dit bij met water uittrekken niet zoo is, waardoor de diastati-sche werkzaamheid in het laatste geval veel kleiner lijkt. Intusschen: welken waarborg hebben wij, dat het bladpoeder de beste afspiegeling der in de cel plaats hebbende diastatische werkzaamheid geeft?

We zagen, dat indrogen der bladen het evenwicht suiker \rightleftharpoons zet-meel geheel verschuift door afsterven der opbouwfunctie, maar wellicht is toch daarbij óók de diastatische werkzaamheid toe-genomen. Er vinden bij droging in ieder geval groote veranderin-gen plaats in de enzymatische verhoudingen, die dit evenwicht be-heerschen en we moeten dus bij een droging als door BROWN en MORRIS uitgevoerd, veranderingen in het diastatisch gehalte voor mogelijk houden. Dat de diastatische werking van bladpoeder maar een matige afspiegeling is, van wat er *in* de plant gebeurt, hebben we reeds eerder aangetoond door het feit, dat indrogende bladen het zetmeel in het blad tot *saccharose* afbreken zonder maltose als tusschenproduct, terwijl het gedroogde bladpoeder het zetmeel *buiten* de plant tot *maltose* hydrolyseert. Met onze con-

clusies moeten we dus zeer voorzichtig wezen, omdat de resultaten verkregen mèt de omzetting van zetmeel door bladpoeder niet maar eenvoudig zijn over te dragen op de omzettingen in de cel.

Een eventueele verschuiving van het evenwicht suiker \rightleftharpoons zetmeel is m.i. beter na te gaan door de bepaling van het zetmeelvormend vermogen uit suikeroplossingen, o.a. bepaling van de grensconcentraties waaruit nog zetmeel gevormd wordt onder overigens volkomen gelijke omstandigheden.

HUNGER (35, 36) geeft aan, dat in de mozaiekzieke planten minder organische zuren, tannine en suikers voorkomen dan in gezonde planten onder overigens gelijke omstandigheden. Hierin ligt een aanwijzing, dat bij de assimilatie der zieke bladen een eenzijdige afzetting in den vorm van zetmeel plaats heeft, omdat er uit blijkt, dat de stoffen, die wij als directe assimilatieproducten in gezonde planten hebben leeren kennen, er minder in voorkomen; het zetmeel meer. Een studie van de physiologie van mozaiekzieke bladen, vergeleken met gezonde bladen, zooals in deze studie begonnen is, zal verder ongetwijfeld tot inzichten in het wezen der storingen leiden.

Ik heb nagegaan of het ook mogelijk was, evenals bij gezonde bladen door indrogen het zetmeel uit de zieke bladen te verdrijven. Ik halveerde eenige bladen, liet een deel in vochtige atmosfeer en de andere helft droog bij 28° C. in 't donker staan. Na 18 uur was in de vochtige atmosfeer het zetmeelgehalte bijna evengroot als bij 't afplukken. Het blad in droge atmosfeer was echter volledig zijn zetmeel kwijt. *Het blijkt dus, dat in sterk mozaiekzieke planten door indrogen van afgesneden bladen (waarbij van „afvoer” dus ook geen sprake is) het zetmeel in zeer korten tijd wordt omgezet.* De chemische analyse toonde ons, dat bij 28° C. evenals bij gezonde bladen geen suikers optreden, bij lagere temperaturen wederom saccharose! Als bij 't drogen de viruswerking dezelfde blijft, krijgen we hier een aanwijzing, dat het geen schadelijke invloed van het virus op de ademhaling¹⁾ is geweest, evenmin op de hydrolyse, maar een bevordering van de opbouwreactie, die nu door het drogen geheel wordt gedood en waardoor de bevorderende invloed van het virus op dit enzym wordt uitgeschakeld. Of het virus bij dit langzaam indrogen echter misschien ook deels gedood wordt, dit zou met infectieproeven zijn te bestudeeren. BEYERINCK (5) zegt: „Stücke von eingetrockneten kranken Blättern in gesunde Pflanzen hineingebracht zeigten sich, selbst nachdem sie zwei Jahre in meinem

¹⁾ Omdat in gedroogde bladen van zieke planten bij 28° C. ook alle suikers bijna direct worden verademd.

Herbarium aufbewahrt waren, als infectionsfähig!" Wel was de virulentie ervan wat gedaald, maar het is de vraag of dit ook reeds bij het korte en zwakke indrogen, dat ik toepaste, het geval is, want BEYERINCK merkt op, dat zelfs „das Alkoholpräcipitat von virulentem Pressaft, nach dem Trocknen bei 40° C. seine Virulenz beibehält." En ook „ist es sicher, dass das Virus im lufttrockenen Boden seine volle Virulenz nach Ueberwintern beibehalten kann".

Den indruk, dien wij hieruit over de physiologische storing krijgen is de volgende: In een gezond Tabaksblad ontstaat bij de assimilatie uit het vastgelegde CO₂ voor een deel zetmeel, hetwelk verder niet aan het stoftransport in eenige belangrijke mate deelneemt. Het dient als materiaal voor de ademhaling. Een ander groot deel der geassimileerde CO₂ komt echter direct in den vorm van andere verbindingen (tannine, organ. zuren, enz.) terug, welke voor het transport naar de jonge organen, zaden, enz. in aanmerking komen.

Bij het mozaiekzieke blad is de opbouw van zetmeel (onder invloed van het virus) dusdanig bevorderd, dat van de door assimilatie gevormde monosen overwegend zetmeel wordt vastgelegd, en slechts weinig als tannine en organische zuren ontstaat (HUNGER). Het gevolg hiervan moet wezen, dat slechts weinig verbindingen voor transport worden gevormd en de groei en ontwikkeling worden geremd. Is het waar, wat HENRICI (31) meent te hebben gevonden, dat zetmeel in de chloroplasten de assimileerende werkzaamheid ervan tegengaat, dan is dit een nieuwe reden voor het klein blijven der mozaiekzieke Tabaksplanten.

Door het mooie werk van QUANJER (66, 67) en zijn medewerkers is aangetoond, hoe uitgebreid virusziekten als plantenziekten voorkomen, waarbij zoover onderzocht steeds de zetmeelophooping als typeerend verschijnsel naast de uitwendige symptomen optrad. Zij vonden de zetmeelophooping in de verschillende bladrolziekten der Aardappels, wezen er op, dat deze stagnatie in de zetmeelomzetting ook aangegeven wordt voor de virusziekten van den Sandelboom door COLEMAN (13) van Anjelieren door LAMKEY, van de Moerbei door SUZUKI (84), van ziekten bij de Perzik (SMITH, (83); NEGER vond hetzelfde voor bladrolziekten van Syringa en Vlier. Bij de Aardappel heeft men ook steeds de gestagneerde zetmeelomzetting, als gestagneerde zetmeelafvoer opgevat en QUANJER meende, dat de phloeemnecrose, welke tevens bij de bladrolziekten door hem werd waargenomen wel de oorzaak der verminderde afvoer en verminderde zetmeelomzetting zou zijn. Het was OORTWIJN BOTJES (62), die aantoonde, dat steeds zetmeelophooping optreedt, alvorens eenige uitwendige ziekte is waar te nemen, en ook eenigen tijd

voor dat phloeemnecrose optreedt. Hij zegt: „Duidelijke necrose van het phloeem is eerst te zien, als de uitwendige verschijnselen der ziekte reeds eenigen tijd zichtbaar zijn.” Het komt echter ook niet bij OORTWIJN BOTJES op om nu in de zetmeelophooping iets anders te zien, dan geremde zetmeelafvoer. Want hij laat er op volgen: „De door QUANJER (66) uitgesproken veronderstelling, dat de uitwendig waarneembare ziektesymptomen een gevolg zijn van *storingen in den afvoer*, wordt hierdoor bevestigd. Dat deze *afvoerstoringen* een gevolg zijn van de necrose van het phloeem komt mij echter niet aannemelijk voor, nu gebleken is, dat zij aan het duidelijk optreden der necrose voorafgaan.”

Nu weten wij wel niet, of ook bij alle andere planten het zetmeel in de bladen niet anders dan ademmateriaal is, voor Aardappelbladen heb ik echter aangetoond, dat dit wel het geval is. Reeds in 1919 schreef QUANJER: „In de tweede plaats kan men de joodreactie van SACHS toepassen op afgesneden bladeren van gezonde en bladrolzieke planten. De proef is genomen met bladeren, die des avonds zijn afgesneden en, met de stelen, in water gedompeld, in een donkere ruimte werden bewaard. Het blijkt dan, dat gezonde bladeren, zij het ook iets langzamer dan wanneer zij aan de plant zijn blijven zitten, hun zetmeel verliezen.” Het is een duidelijk bewijs, hoe men aan de opvattingen van SACHS vastzat, dat hierbij niet het idee opkwam, dat zetmeelomzetting met zetmeelafvoer niets te maken heeft. MURPHEY (59) is de eenige van de vele onderzoekers der Aardappelrolziekten, die hieruit een andere en juistere conclusie trok. Hij zegt: „When a normal potato shoot or leaf is cut off and placed with its end standing in water in the dark, it loses its starch in a comparatively short time; but the process is one of hydrolysis of the starch and eventual consumption of the resulting sugar in respiration, and not of translocation in the general accepted sense of the word”. En hij voegt er nog terecht aan toe: „Even the apparent transference of starch from the leaf-blades to the petiole is largely illusory”.

Ik heb de proeven met gezonde aardappelbladen herhaald, hierbij de afgenomen bladhelften niet in water gezet, doch in een met waterdamp verzadigde atmosfeer gelegd, zoodat elke afvoer ten eenenmale was uitgesloten. Het bleek toen, dat het zetmeel, evenals bij de Tabak uit de afgesneden bladen slechts *iets* langzamer verdween, dan uit die welke, aan de plant verbleven onder dezelfde omstandigheden. Hieruit volgt naar analogie met de Tabak, dat ook hier het zetmeel niet meer in eenigszins belangrijke mate aan het transport deelneemt, maar als materiaal voor de ademhaling (in

zijn afbrekingsproducten) wordt verbruikt. *Phloeemnecrose* noch de *beschadiging van welke afvoerbaan ook kan daarom de oorzaak der verminderde zetmeelhydrolyse zijn.*

De proef, die ik vervolgens deed was om te onderzoeken, of ook hier door een indrogen van het blad het zetmeel kon worden omgezet. Evenals bij de mozaiekzieke Tabak, was het mogelijk door het indrogen van afgesneden rolzieke bladhelften het zetmeel in korten tijd te doen verdwijnen, waar tegenover de overeenkomstige bladhelften in vochtige atmosfeer het zetmeel zeer constant behielden. Evenals bij de Tabak zullen wij dus bij de Aardappel eenzijdige opbouw van zetmeel uit de geassimileerde suikers, als oorzaak der zetmeelophooping, als oorzaak van de geringere ontwikkeling van de plant moeten opvatten.

Het is wellicht goed hierop duidelijk te wijzen, omdat afgezien van MURPHEY ieder zoo van de juistheid dezer uitkomsten van SACHS is verzekerd, dat zetmeelafvoer en zetmeelomzetting, als één ding worden beschouwd. Zoo concludeert HILTNER (32) als resultaat zijner waarnemingen „dass die Krankheit zurückzuführen ist auf eine Störung der Stärkewanderung und dass das Geheimnis der Blattrollkrankheit in den Ursachen dieser Störungen zu suchen ist.” ESMARCH (24) geeft als resultaat: „Es ergibt sich mithin, dass die Stärkeableitung bei rollkranken Pflanzen gehemmt oder vollständig unterbunden ist.” Interessant is ook het resultaat van NEGER (61), dat wanneer men bladrolzieke bladen laat verwelken het zetmeel eruit verdwijnt, hetgeen ook door mij als algemeen verschijnsel gevonden werd en dat als oorzaak het afsterven der zetmeelsynthesefunctie heeft. Hij zegt: „Am vollkommensten ist die Stärkeumwandlung bei Blättern, welche, trockener Luft ausgesetzt, schnell welken.” Hij licht dit met duidelijke foto's toe. NEGER ziet hierin een „Abhängigkeit der Stärkeableitung vom Luftzutritt”. Door het verwelken, zou er een sterkere zuurstoftoetreding zijn. NEGER is hier met zichzelf in tegenspraak, omdat hij een bladzijde verder bij de bestudeering der huidmondjes zelf bewijst, dat bij het verwelken, in gezonde en zieke bladen zich de huidmondjes geheel sluiten en dus van een vermeerdering der luchttoetreding door verwelken toch heelemaal niet kan worden gesproken! En terecht zegt MURPHEY: „An even more rapid disappearance of starch is to be observed (as NEGER also noted) in the case of cut leaves and shoots which are not put standing in water, and which wilt in consequence. The obvious conclusion, however, that translocation could not account for the disappearance in this case was not drawn by this worker.” Want ondanks deze waarnemingen komt NEGER

tenslotte nog tot het resultaat: er is voor het niet oplossen van zetmeel „nur eine Erklärung zu geben: nämlich *mangelhafte Ableitung der Spaltungsprodukte*”.

Nu meent NEGER, dat diastase van bladrolzieke bladen een grootere diastatische werkzaamheid bezit dan die van gezonde planten ¹⁾. Dat dit weinig zegt, gaf ik reeds eerder aan, want als het virus de zetmeelopbouw nog sterker katalyseert dan de hydrolyse is het eindresultaat: eenzijdige zetmeelopheoping. Wat wel bewezen wordt is, dat het virus invloed heeft op de enzymen, of zooals NEGER het wat voorzichtiger zegt „es sich hier um eine schwere Störung der enzymatischen Vorgänge in der Pflanze handelt”. Uit de werking der gedroogde bladen is echter niet eenvoudig op de levende plant terug te besluiten. En ook NEGER zelf zegt, dat wellicht de diastase *in* de plant door bepaalde omstandigheden in zijn werkingen zou kunnen worden geremd. Hierop antwoordt OORTWIJN BOTJES (62): „Deze conclusie is ongerijmd, want de hoeveelheden diastasen laten zich tot nu toe niet bepalen afgescheiden van hare werking”. Al is dit laatste helaas waar, er kan daarom toch een verschil wezen tusschen de diastatische werkzaamheid buiten de plant, zooals NEGER en anderen hem meten en *in* de plant, waar het ons om te doen is, en welke laatste werkzaamheid we niet direct kunnen bepalen.

Als conclusie: ik acht het bewezen, *dat de zetmeelopheoping of langzame omzetting van zetmeel in bladrolzieke Aardappels niets te maken kan hebben met afvoer-kwesties, maar aan een eenzijdige verschuiving van de enzymen onder invloed van het virus is toe te schrijven, hetwelk wellicht ook de necrose der zeefvaten veroorzaakt.*

Bij de virusziekten waarbij wel zetmeelopheoping, maar geen phloeemnecrose valt waar te nemen, zou toch de verklaring der afvoerstoring als oorzaak moeten falen, terwijl de hier gegeven oplossing voor alle virusziekten geldig zou kunnen blijken.

Evenzoo is het *plaatselijk* zich ophoopen van zetmeel in de zieke lichtere plekjes van mozaiekzieke Tabaksbladen nooit te verklaren door storingen in den afvoer. Dan zou het heele blad immers min of meer gelijkmatig de gevolgen hiervan moeten ondervinden. Zoekt men het echter in een verschuiving van het enzymatische systeem zetmeel \rightleftharpoons suiker onder invloed van de ziekteoorzaak (het virus) dan is hiertegen tenminste a priori geen enkel bezwaar.

¹⁾ De uitgevoerde reactie met guajachars en waterstofperoxyd is trouwens geen reactie voor diastase.

XI. VERANDERINGEN BIJ HET DROGINGS- EN FERMENTATIEPROCES, MEER SPECIAAL IN HET KOOLHYDRATENGEGEHALTE.

De veranderingen welke bij het drogingsproces en de fermentatie plaats grijpen moeten tot de eigenschappen van superieur tabaks-(dek)blad leiden.

Wat zijn de eigenschappen van superieur dekblad?

De practicus en tabakshandelaar stellen speciale eischen, zooals groot bladoppervlakte, een bepaalde kleur, een goede brandbaarheid, een goede elasticiteit, een bepaalde reuk en aroma, enz. Tot nu toe weet men echter zeer onvoldoende met welke chemische eigenschappen al deze voorwaarden correspondeeren. Dit ligt waarschijnlijk o.a. daaraan, dat b.v. de brandbaarheid door meerdere chemische eigenschappen wordt bepaald, terwijl aan den anderen kant een betere chemische samenstelling gunstig voor de brandbaarheid, ongunstig voor 't aroma kan zijn; m.a.w., dat de uiterlijk gewenschte eigenschappen niet door enkele chemische hoedanigheden gedekt worden. Door deze groote ingewikkeldheid weet men uiterst weinig over de chemische samenstelling van een ideaal gefermenteerd tabaksblad, kan men op deze gronden ook geen aanwijzingen geven over de beste voorwaarden van droging en fermentatie, en blijft deze heele bewerking beheerscht door practijk en empirie.

Hoogstens kan men eenige chemische eigenschappen opnoemen, welke goed dekblad bezit. Zoo is men het er wel over eens, dat een hoog gehalte aan eiwitten en b.v. Chloor en SO_3 schadelijk, een hoog gehalte aan Amido-N, aan (gebonden) organische zuren, K en carbonaten gunstig voor de kwaliteit der tabak zijn. Zoo is voor het aroma de omzetting van eiwitten tot amiden (asparagine b.v.) en organ. zuren waarschijnlijk voordeelig. Want zegt b.v. FESCA (25) „so werden sie (de amiden) doch mit wenig Ausnahmen (Tyrosin) einen weit unangenehmer Geruch verbreiten als die verbren-

nenden Eiweisskörper'', en: „Durch Zersetzung kann sich aus bei der Verbrennung übel riechenden Eiweisskörpern die besser riechende Aepfelsäure bilden''. Maar zou men er bij de droging en fermentatie alleen op uit zijn om dit te bereiken, dan werden vele andere voorwaarden voor goede kleur, aroma, enz. verwaarloosd. Voorloopig is men er dan ook nog zeer ver van af deze bewerking wetenschappelijk te begrijpen en daardoor te leiden. Aan het voorkomen en de omzetting van *zetmeel en suikers* heeft men bij deze bewerking ook dikwijls groote beteekenis gehecht. Volgens *Fesca* mag men zeggen „dass Stärke und Zuckergehalt des fermentirten Rauchguts die Qualität desselben verringern; denn beide liefern in ihren Verbrennungsprodukten nicht gerade angenehm riechende Verbindungen''. Ook voor de elasticiteit achtte men aanwezigheid van zetmeel minder gewenscht, zoo zegt b.v. *GARNER* (26), „if there is no means of removing this starch, the tobacco is harsh, lifeless, and „strawy''''. Ook in Ned. Indië meenden *HUNGER*, e.a., dat zetmeelaanwezigheid slecht voor de kwaliteit was, waarom zij dan ook aanraadden het blad 's morgens vroeg te plukken, als er een minimum van zetmeel in aanwezig was. Tot geheel andere conclusies kwam echter *MÜLLER—THURGAU* (56), die 126 soorten tabak uit verschillende deelen van de wereld onderzocht op het zetmeelgehalte. Er waren er bij, die geen of weinig, maar ook die tamelijk veel en zelfs sommige, die veel zetmeel bevatten. Echter „konnte ein Zusammenhang zwischen Stärkegehalt und Qualität nicht sicher festgestellt werden. Es scheint, dass die besseren Sorten durchschnittlich eher Stärke enthalten, als die geringeren, doch gibt es hiervon sehr viele Ausnahmen''.

Over een dergelijk principieel punt is men het dus niet eens. Toch is *MÜLLER—THURGAU* de eenige, die veel materiaal onderzocht heeft, terwijl de overigen meest hun conclusie trokken uit één soort tabak. En het is zeer wel mogelijk, dat daarbij de slechte kwaliteit „toevallig'' ook zetmeel bevatte, terwijl de eigenlijke oorzaak in andere eigenschappen gelegen was.

Maar nog om andere redenen lijkt het mij toe, dat men de beteekenis van de aanwezigheid van zetmeel voor de kwaliteit van het blad overschat heeft. Dit zal uit het volgende blijken.

Wanneer beschouwt men een tabaksblad „rijp'' voor den pluk?

Het hoeft niet te verwonderen, dat waar men niet weet welke chemische eigenschappen het (gefermenteerde) eindproduct moet bezitten, men eveneens zeer vage voorstellingen heeft van de chemische eigenschappen, die het blad moet hebben, om het best te zijn voor den pluk. De practicus ziet het o.a. aan het optreden van

gele vlekken, een criterium, dat het blad „rijp” wordt. Wel heeft men weer onderzocht enkele chemische eigenschappen, die het blad op dit moment bezit.

Volgens MÜLLER—THURGAU, die in Duitschland waarnam, gaat het rijp worden samen met ophooping van zetmeel in de bladen; ja, zelfs is dit zetmeelgehalte volgens hem juist datgene, wat de rijpheid bepaalt, want eindelijk worden de chlorophylkorrels zoo vol ervan, dat zij springen en de typische gele kleur is hiervan het gevolg. Zoo zegt hij: „In reifenden Tabaksblättern häuft sich die Stärke immer mehr an, so dass die Masse der Chlorophylkörner durch dieselbe schliesslich verdrängt wird, was zu der bekannten, die Reife anzeigenden Verfärbung Veranlassung gibt”.

In Ned. Indië heeft men een uitgebreid onderzoek gedaan naar den besten tijd, om het tabaksblad te oogsten. Ook daar acht de practicus het blad rijp, wanneer de uiterlijke kenmerken, als het optreden van de gele verkleuring, plaatselijk zichtbaar worden. JUL. MOHR (53) vond echter, dat ook de tijd van den dag, waarop men tenslotte oogst, voor de kwaliteit van het gefermenteerde eindproduct van belang is. Het resultaat op de verschillende ondernemingen bereikt, stemde vrijwel overeen, en wel in dien zin, dat morgen-, middag- en avondpluk — bij gelijke behandeling gedurende droging en fermentatie — een verschillend product leveren, zóó, dat de morgenpluk superieur dekblad geeft, dat in het algemeen valer, lichter van kleur en lichter van gewicht is en een groote brandbaarheid bezit. Als voorbeeld haal ik eenige resultaten aan van J. SCHMIDT (79) op de onderneming „Bekioen”:

Geoogst om	6 uur v.m.	8 uur	10 uur	12 uur	2 uur n.m.	4 uur
Perc. donkere kleuren ..	43.2	42.7	42.3	29.6	22.7	22.2
„ lichte ..	56.8	57.3	57.7	70.4	77.3	77.8
Percentage vaal	38.6	31.8	34.3	24.9	21.4	23.3
„ bont	29.2	31.5	34.2	42.6	38.7	42.8

Hetzelfde groote verschil tusschen morgen- en avondpluk vond ook HUNGER;

	Geoogst 6 uur v.m.	Geoogst 4 uur n.m.
Gemiddelde dikte in mm/100	21.5	25
Brandbaarheid in sec.	71.5	41.5

Naar aanleiding hiervan hechte HUNGER (34) groote beteekenis aan de aanwezigheid van zetmeel in de bladen op het oogenblik, dat deze geplukt worden. In Deli bevat het Tabaksblad — afgezien

van koele nachten — 's morgens geen zetmeel in tegenstelling tot 's middags. Hij meende nu, dat de *betere* kwaliteit der vroegpluk o.a. een gevolg was van het *ontbreken van zetmeel*.¹⁾

In Deli acht men dus een blad rijp, d.w.z. het geschiktst voor den pluk als het *geen zetmeel* bevat, terwijl MÜLLER—THURGAU meende, dat de rijpheid physiologisch werd bepaald door een *overvuld zijn met zetmeel*!

De conclusie, die men hieruit kan trekken is, dat het zetmeelgehalte geen groote beteekenis heeft bij den pluk, dat het iets bijkomstigs is, terwijl waarschijnlijk andere verhoudingen, in het eiwitgehalte b.v., (die niet zoo eenvoudig te bestudeeren zijn als het zetmeelgehalte met de Jodiumproef en daarom niet in de eerste plaats zijn nagegaan) voor de verschillende kwaliteit moeten worden aansprakelijk gesteld.

Door de resultaten van mijn onderzoek word ik hiertoe trouwens ook geleid. Wat zal namelijk het verschil tusschen een door droging verkregen zetmeelrijk blad uit den middagpluk en een dergelijk zetmeelarm blad uit den vroegpluk na droging kunnen wezen?

Het eerste zet door de uitdroging, zooals deze in Deli plaats vindt (n.l. zeer geleidelijk) zijn zetmeel in korten tijd tot suikers om, welke worden verademd. Het blad uit den vroegpluk heeft in den nacht zijn zetmeel reeds omgezet tot materiaal, dat zooals we weten ook voor 't overgrootste deel verademd wordt. Bij de daaropvolgende droging zullen in het koolhydratengehalte geen veranderingen meer intreden²⁾. Ook op deze wijze moet men tot de conclusie geraken, *dat het zetmeelgehalte bij den pluk geen invloed op de kwaliteit van het gedroogde en gefermenteerde blad kan hebben.*

Men heeft echter te veel over het hoofd gezien, dat gedurende dag en nacht periodieke schommelingen intreden, niet alleen in het koolhydratengehalte en de verhouding der verschillende koolhydraten onderling, maar ook waarschijnlijk in dat van andere bestanddeelen, als tannine, de N-verbindingen en de organische zuren, van welke laatste men bovendien het er — in tegenstelling tot 't zetmeelgehalte — over eens is, dat zij voor de kwaliteit groote beteekenis hebben.

In verschillende onderzoekingen treft men aanwijzingen aan, welke voor deze opvatting pleiten. ADOLF MAYER (48) deed in 1889 te Wageningen bepalingen over den invloed der omstandigheden op het Nikotine-gehalte. Hij omwikkelde eenige bladen eener

¹⁾ HUNGER pag. 56.

²⁾ Om de eenvoudige reden, dat er bij den pluk practisch geen koolhydraten meer in voorkomen.

Tabaksplant met stanniol en onderzocht na eenige weken. Het Nikotine-gehalte bedroeg toen in % van het drooggewicht bij:

Blätter im vollen Lichte	4.4 %
Blätter derselben Pflanze beschattet	2.2 %

Andere overeenkomstige proeven wezen in dezelfde richting. Ook meende ADOLF MAYER verschillen te vinden tusschen warmer en kouder gekweekte planten, n.l. resp. in den zomer en in den herfst opgegroeid. Het hooger gehalte der warmer gekweekte planten kan echter ook aan de langere en sterkere belichting liggen gedurende de zomermaanden.

OSCAR LOEW (43,44) bepaalde de zuurgraad van de bladen 's morgens en 's avonds. Hij komt tot het resultaat, that „the acidity is greater in the morning than in the evening”, b.v.:

cc $\frac{n}{10}$ soda solution required by 10 cc juice.	
Midrib of leaf (evening)	1.5
Midrib of leaf (morning)	2.1

Wat *tannine* betreft gelukte het aan CAVAZZA „festzustellen, dass die Laubblätter ein tägliches Gerbstoffminimum gegen Sonnenaufgang, und ein Maximum gegen 6 Uhr nach Mittag aufweisen”. In overeenstemming hiermede vond BÜSGEN „dass Sonnenblätter 3—4mal soviel Gerbstoff enthalten, wie Schattenblätter”, terwijl ook KRAUS en WESTERMAIER merkten „dass gesteigerte Belichtung der Blätter deren Gerbstoffreichtum vermehrt, und dass panschierte oder etiolierete Blätter weniger Gerbsäuren enthalten als grüne Blätter”. (CZAPEK, Biochemie der Pflanzen, Bd. 3, 2de druk, pag. 516—521).

Alles wijst er zoo op, dat ook andere organische verbindingen toen afnemen in den loop van een etmaal, evenals de koolhydraten. Zagen we bovendien niet, dat slechts een gering deel van het geassimileerde product in den vorm van koolhydraten wordt teruggevonden, omdat er direct ook andere organische verbindingen uit ontstaan. Men bedenke steeds, dat uit het primaire assimilatieproduct alle andere organische verbindingen worden gevormd. „The sugar is the material from which not only the cellulose, starch, fat and protein, but also wax, tannin, and resin of the leaves are produced” merkte LOEW (44) zeer terecht op. En waar wij nu in ieder geval bij Tabak vonden, dat onder normale gezonde omstandigheden deze suiker *onmiddellijk* aan het celsap wordt onttrokken voor de vorming van andere verbindingen, voor een deel slechts zetmeel, ligt 't dan ook voor de hand, dat deze andere organische

verbindingen eenzelfde soort periodiciteit in den loop van een etmaal zullen ondergaan als het zetmeel.

De rijpheid van het blad zocht LOEW trouwens reeds in een andere richting. Niet zooals MÜLLER—THURGAU stelt hij het zetmeel aansprakelijk voor de gele verkleuring (wat ook onjuist is, omdat in Deli rijpe zetmeelvrije bladen eveneens geel worden), maar hij zegt: „By the accumulation of nicotine, oxidizing enzymes, and acids a state is finally reached in which the normal deep green color of the chlorophyll grains gives way to a yellowish color”. Het watergehalte van „rijpe” bladen is dientengevolge volgens LOEW slechts 83 %, van onrijpe 88 %. Bij overrijpe bladen neemt het droge-stofgehalte daarentegen weer af.

Per gelijke bladoppervlakte weegt een rijp blad gem. $1.4 \times$ zooveel als een jong blad, terwijl de oplosbare organ. bestanddeelen $2.5 \times$ zooveel voorkomen als in een jonger blad.

Volgens LOEW zijn het vnl. „nicotine and protein compounds that increase in the ripe leaf”.

Zoo staat dus buiten allen twijfel vast, dat in Deli de morgenpluk een beter product levert dan de avondpluk. Echter is het onwaarschijnlijk, dat deze kwaliteit samenhangt met het zetmeelgehalte bij den pluk, maar veeleer met andere secundaire producten van de assimilatie, zooals eiwitten, organische zuren, vetten, tannine, e.a., bij welke een soortgelijke toe- of afname te verwachten is als bij het zetmeel, waarvoor in de litteratuur trouwens meerdere aanwijzingen te vinden zijn.

Nog een oogenblik wil ik stilstaan bij eenige veranderingen, die gedurende het drogings- en fermentatieproces optreden.

De veranderingen, welke het rijpe blad moet ondergaan, hebben plaats gedurende de droging en de fermentatie. „Droging” is eigenlijk een zeer slecht woord, omdat het niet alleen, zelfs niet in de eerste plaats, neerkomt op het verliezen van water. Gedurende dit proces hebben belangrijke omzettingen plaats in het half levende blad, waarvan vele functies langzamerhand afsterven, vele chemische en enzymatische processen echter nog eenigen tijd zeer intensief doorgaan. De Amerikanen noemen het proces dan ook „curing”, wat zooals b.v. GARNER (26) aangeeft veel meer inhoudt dan „drogen”. Hij zegt: „If the temperature is low, the curing changes are stopped, although the tobacco may continue to dry out. In this case the leaf is simply dried and not cured.”

BEHRENS (3) ging de veranderingen na in de chemische samenstelling gedurende het drogen. De voornaamste veranderingen komen in de volgende tabel voor:

100 Gram drooggewicht bevat aan:	Kohlenstoff	Eiweis-Stickstoff	Nichteiw. Stickstoff	Nikotin	Stärkemehl	Organ. Säuren (bereich- net als Äpfelsäure)	Alkalinität (‰ K_2CO_3)	Ätherextract	Salpetersäure (N_2O_5)	Schwefelsäure (SO_3)	Phosphorsäure (P_2O_5)
Bladen direct na pluk	40.25	3.604	0.766	0.766	Voll	6.30	3.52	11.81	0.244	6.806	0.735
Bladen „dachreif“	29.31	2.051	2.431	1.102	0	10.96	4.40	8.16	0.297	0.492	0.873

Afname van eiwit, vetachtige stoffen en een volledig verdwijnen van het zetmeel, maar daar tegenover een toename van de afbrekingsproducten van eiwit, een toename van de zuren en misschien van nikotine.

Het betreft hier bladen als „plukblad” geoogst. Wordt als snijblad geoogst, dan gaat een deel der in het blad aanwezige stoffen gedurende het drogen in den tabaksstengel over. JUL. MOHR (53) vond, dat zoowel van de aschbestanddeelen, als van de organische stof 11 % minder in het „snijblad” voorkomt. Het zijn volgens de onderzoekingen van MOHR vnl. de kali- en ammoniakzouten der organische zuren, in hoofdzaak appelzuur, die hierbij in den stengel overgaan, wat voor de kwaliteit niet bevorderlijk kan wezen.

Van deze organische zuren, die bij de droging vermeerderd worden, merken we, dat ze ook reeds in het levende blad in belangrijke mate (grootendeels gebonden) voorkomen. KISZLING (39) vond bij onderzoek van verschillende Tabakssoorten aan watervrij appel- en citroenzuur 8—12 % van het drooggewicht. Citroenzuur kwam gemiddeld het meest voor, daarna appelzuur en verder nog omstreeks $2\frac{1}{2}$ % oxaalzuur.

Ook VAN BIJLERT (7) wees er op, dat in het levende blad het grootste deel der basen aan organische zuren gebonden moet zijn. Hij vond n.l., dat de som der aequivalente anorganische basen voor één soort en één klimaat vrijwel constant is. Daar het celsap eenigszins zuur reageert, moeten deze basische bestanddeelen gebonden voorkomen. Uit het gevonden SO_3 , Cl en P_2O_5 kan men gemakkelijk berekenen, dat niet meer dan $\frac{1}{5}$ of $\frac{1}{6}$ van de aequivalente basen hierdoor gebonden kan worden, zoodat de rest geheel door organische zuren moet zijn gebonden.

108 *Koolhydraten in Tabaksblad bij droging en fermentatie.*

De veranderingen welke gedurende de fermentatie plaats grijpen zijn o.a. door BEHRENS (3) en VAN BIJLERT (7) onderzocht. De laatste onderzocht voor het gedroogde en gefermenteerde product ongelijksoortige tabakken, terwijl de eerste niet slechts gelijksoortige tabak voor het chemisch onderzoek gebruikte, maar zelfs corresponderende bladhelften, waardoor de vergelijking veel meer waarde krijgt. Hij vond o.a.:

	„dachreif”	„fermentiert”
Eiweiss-Stickstoff	1.30 %	1.36 %
Nikotine	1.464 %	1.075 %
Ätherextract	9.41 %	8.34 %
Reduzierender Zucker	1.26 %	0 %
Organische Säure, als Äpfelsäure	16.81 %	14.45 %

Zulke intensieve omzettingen, als bij de droging, vinden niet meer plaats. D.w.z. de destructie van eiwit, chlorophyl (verandering van groen in geel), maar ook de omzetting van eventueel aanwezig zetmeel kan, als dit niet bij de droging heeft plaats gehad, bij de fermentatie niet meer gebeuren (zie KISZLING, *Der Tabak*, 1920, Pag. 304), omdat dan de diastatische en proteolytische enzymen afgestorven zijn (zie o.a. OSCAR LOEW, Rep. 65 U.S. Dep. of Agric., pag. 16, e.v. en pag. 40). Bij de fermentatie zijn het vnl. oxydeerende processen, die op den voorgrond treden. Men ziet de nikotine afnemen, de suiker verdwijnen en het gehalte aan organisch zuur ook wat afnemen. Maar die veranderingen, welke de bruine kleur en het speciale aroma te voorschijn roepen, hebben juist gedurende de fermentatie plaats. Zoo meent LOEW (44), dat de bruine kleur onstaat door de werkingen van oxidase. En wat het aroma betreft zegt hij: „The fine odor and genuine aroma are generated bij the sweeting process. Cured tobacco, even from the best sources, has a mere straw odor”.

Wat de koolhydraten gedurende het drogings- en fermentatieproces betreft, hierover zijn slechts weinige — en dan wegens de gebezigde methoden nog dikwijls zeer twijfelachtige — uitkomsten te vinden. In het algemeen heeft men het onderzoek van tabaksbladen in diverse stadia steeds gericht op de N-verbindingen, de organische zuren, de nikotine, de anorganische bestanddeelen en de vetachtige verbindingen (etherextract), maar om de koolhydraten heeft men zich weinig bekommerd. Noch KOSUTANY of VEDRÖDI (90) bij het onderzoek van Hongaarsche tabakken, noch FESCA EN IMAI (25) of LEHMANN en LOBATA (41) van Japansche Tabakken,

noch VAN BIJLERT of MOHR bij het onderzoek van Delitabak, noch LOEW (44) of GARNER (24) in Amerika hebben eenige bepaling van koolhydraten gedaan, terwijl BEHRENS (3) in Duitschland zich met eenige Iodiumproeven voor de zetmeelbepaling en eenige weinig nauwkeurige bepalingen van „reducerende suiker” tevreden stelt. Intusschen deed alleen een uitgebreid onderzoek naar het gedrag van zetmeel en suiker MÜLLER—THURGAU (56), waarop we uitgebreider ingaan, omdat er vele voor ons belangrijke opmerkingen in voorkomen, maar ook hier waren de gebruikte methoden niet nauwkeuriger dan door BEHRENS gebezigd. Als KISZLING (39) dan ook in zijn „Handbuch der Tabakkunde” in 1920 opmerkt „Wünschenswert sind weitere eingehende Untersuchungen über das Verhalten der in reifen Blättern vorhandenen Stärke- und Zuckermengen während des Trockenvorganges” ben ik het hiermede geheel eens, omdat zooals in Duitschland, waar men het blad propvol met zetmeel (MÜLLER—THURGAU spreekt zelfs van 50 % van het drooggewicht) te drogen hangt, het toch beteekenis heeft, wat met al dit zetmeel gebeurt, in welke verbindingen het eventueel teruggevonden wordt.

In bijna alle publicaties over Tabak heeft men zonder eigen onderzoek zich laten leiden door de uitkomsten van MÜLLER—THURGAU, waarom ik hierop wat uitgebreider wil ingaan. Het zetmeelgehalte der bladen werd bepaald meestal naar de sterkte der kleuring met Iodium. In enkele gevallen werd het materiaal gedroogd bij 100° C., met warm water uitgetrokken, terwijl men het op het filter achterblijvende gedeelte kookte „mit stark verdünnter Salzsäure während 1.5 Stunden” en uit het gevonden suikergehalte het zetmeel berekende. Deze suikerbepaling ging evenals die in het filtraat der uitgetrokken bladen op niet nader aangegeven wijze. Aangezien echter de methode voor de juistheid der uitkomsten van groote beteekenis is, valt het moeilijk hierover een uitspraak te doen. MÜLLER—THURGAU spreekt voortdurend over „Zucker” zonder meer. Waarschijnlijk heeft hij het directe reductievermogen bepaald van het filtraat, evenals BEHRENS bij zijn bepalingen, welke laatste dan van „Glykose” spreekt. Nu leveren deze bepalingen, zonder voorafgaande verwijdering der tanninen, glykosiden, enz. met basisch loodacetaat, veel te hooge uitkomsten. BEHRENS bepaalde de „Glykose gewichtsanalytisch durch Wägung des aus dem Kupferoxydul reduzierten Kupfers”. Echter geeft BEHRENS zelf de onnauwkeurigheid van zijn bepaling aan! Hij vond n.l. in tegenstelling tot zijn verwachting in gefermenteerde tabak nog hoeveelheden „eines FEHLINGS Lösung reduzierenden Körpers”, maar zegt

hij „Derselbe dürfte indes wesentlich Tabakgerbsäure gewesen sein”.

Wij moeten dan ook bij de uitkomsten van MÜLLER—THURGAU in acht nemen:

1. dat de kwantitatieve bepaling van het zetmeel door koken $1\frac{1}{2}$ uur met zwak zoutzuur aan nauwkeurigheid te wenschen overlaat;
2. dat de bepaling van „suiker”, waarschijnlijk plaats heeft door bepaling van het directe reductievermogen van 't *niet* met *basisch* loodacetaat behandelde bladaftreksel;
3. dat daardoor de uitkomsten van reduceerende suiker te hoog worden, en geen scheiding tusschen monosen en maltose gemaakt kan worden;
4. dat de saccharose heelemaal buiten beschouwing wordt gelaten, hoewel deze suiker volgens onze eigen resultaten de belangrijkste suiker uit 't tabaksblad vormt.

MÜLLER—THURGAU (56) stelde zich als gevolg van zijn uitkomsten het volgende voor: Het zetmeel verdwijnt gedurende den nacht voor een deel uit de bladen. De snelheid van de afvoer is het, die de snelheid der zetmeelomzetting beïnvloedt. Intusschen neemt de „Zucker”, die in slechts kleine hoeveelheden in het blad voorkomt, ook gedurende den nacht af.

Hij geeft hierbij o.a. de volgende uitkomsten: het zetmeelgehalte van een onrijp blad daalt van 21 op 17 % van het drooggewicht, de „Zucker” van 1 tot 0.5 %. Deze uitkomsten zijn groter dan de mijne, wat aan de verschillende wijze van kweeken (bij ons in de kas bij matige belichting in Maart en September) en aan de verschillende methode der koolhydratenbepaling kan liggen.

Wat gebeurt er nu bij het drogen? Hij ziet nu bij langzame droging: „Der Stärkegehalt nimmt fortwährend ab und zwar anfangs sehr rasch”. Een uitzondering hiervan maakten bladen in de zon gedroogd en die „sehr rasch trockneten. Diese enthielten nach dem Trocknen durchschnittlich mehr Stärke als die normal getrockneten”. Een andere belangrijke waarneming was: „Am Nachmittag geerntete Tabaksblätter entleeren sich beim Trocknen ebenso vollständig, wie die am Vormittag gebrochenen”. Voorts is interessant, dat terwijl de eerste dagen bij het drogen het zetmeel in de „Randpartien” eerder verdween dan in het overige bladgedeelte, gedurende die dagen een belangrijke toename van het zetmeel in de nerven optrad, die echter bij langer drogen weer in een afname overging. Deze waarnemingen van MÜLLER berusten op de Jodiumproef en zijn aan geen twijfel onderhevig. Hoe stelde MÜLLER zich

nu deze afname van het zetmeel voor, terwijl de afvoer, die volgens hem dit proces beheerscht, afgesneden was. Hij zegt „Ist dagegen das Blatt abgebrochen, so steht sämtliche entstehende Zucker den athmenden Zellen zur Verfügung, was die Athmungsintensität erheblich steigert. Ja es ist nicht unwahrscheinlich, dass gerade in Folge der verstärkten Athmungsvorgänge andererseits auch die Umwandlung der Stärke in Zucker beschleunigt und hierdurch wieder die Athmung noch mehr gesteigert werden kann.” Volgens M.—TH. zou dus de suiker uit het zetmeel ontstaan door versterkte ademhaling en de versterkte ademhaling door deze omzetting verklaard worden.

Dat dit geen verklaring is, en dat men met MÜLLER's veronderstellingen ook geen oplossing kan vinden, is zonder meer duidelijk.

Het was dan ook wellicht daarom, dat BEHRENS (3) naar een andere oplossing zocht. Hij zag de versterkte ademhaling als gevolg van het aanbrengen der sneevlakte aan. Zoo zegt hij (Versuchsstationen, 1894, pag. 283): „Da im reifen Blatt, eine Wanderung der Kohlenhydrate nur in sehr beschränktem Masse stattfindet, so muss der Anstoss zu diesen Ausgiebigen Dislokationen wohl in der Herstellung der Bruch- resp. Schnittfläche an der Basis des Blattes resp. der des Stammes gesucht werden.” Nu is ook de onhoudbaarheid van deze veronderstelling door de volgende feiten zeker bewezen:

1. juist *langs* de sneevlakten verdwijnt het zetmeel niet;
2. brengt men sneevlakten aan, maar houdt men het blad in een vochtige atmosfeer, dan gaat de zetmeelomzetting slechts langzaam;
3. brengt men geen sneevlakten aan, maar laat men de bladen aan een plant slap worden en indrogen, dan verdwijnt het zetmeel zeer snel.

Als resultaat van mijn proeven moet ik dan ook de oorzaak in het *drogen* der bladeren zelf zoeken en wel als volgt. In een levend frisch blad heeft men opbouw van zetmeel uit suikers en direct tegelijk daarnaast ook afbraak er van. Droogt men nu een blad langzaam in, dan sterft als gevolg hiervan de eerste functie zeer snel af, terwijl de diastatische functie het veel langer uithoudt. Het gevolg hiervan is een afbraak van zetmeel en een vorming van de afbrekingsproducten zonder dat deze, zooals in een frisch blad, weer tot zetmeel worden gecondenseerd. Een langzaam drogend blad breekt daardoor zijn zetmeel snel af, ook zonder dat het noodig is, dat de gevormde suiker nu direct verademd wordt. Is de temperatuur niet

112 Koolhydraten in Tabaksblad bij droging en fermentatie.

te laag, en de hoeveelheid zetmeel, die omgezet wordt niet te groot, dan zal wel het grootste deel direct verademd worden, evenals wij bij de indrogende Tabaksbladen (behalve van $1\frac{1}{2}$ — 10° C.) waarnamen, wanneer het zetmeelgehalte omstreeks 15 % van het drooggewicht was.

Door de welwillendheid van den Heer VAN SCHAİK, Tabaksbouwer te Elst was ik in staat Tabak uit de droogschuur (September) op 't koolhydratengehalte te onderzoeken.

De resultaten waren als volgt:

	Vochtgehalte (zonder nerven)	Per 1Gr. drooggewicht		Zetmeel volgens de Iodiumproef van SACHS	Zetmeel p. 1 Gram drooggew.
		Totale suikers	Saccha- rose		
Directv.'tveld ¹⁾	87.8%	6	3	pikzwart	207
Na 3 dagen ..	74.5%	7	3	matig zwart	48
Na 10 dagen ..	44.8%	1	—	Volkomen vrij v. zetmeel, behalve langs scheurtjes.	—

Na 10 dagen, waarschijnlijk al eerder was de heele koolhydraten-voorraad uit het blad reeds verdwenen, zoodat het onderzoek van gedurende 1 maand gedroogde bladen in dit opzicht ook geen verandering meer te zien gaf ²⁾. Men kan het proces vergelijken met wat DELEANO bij zijn afgesneden Vitisbladen waarnam: het suikergehalte blijft zoolang op peil, totdat het verlies door de ademhaling nog uit de zetmeelvoorraad kan worden aangevuld. Daarna daalt het reeds geringe suikergehalte tot vrijwel nul. Alleen heeft hier het drogingsproces de omzetting van zetmeel zonder twijfel nog wat bevorderd, hetgeen ook de ademhaling de eerste dagen zal hebben versterkt.

Het achterblijvende zetmeel langs de scheurtjes toont ons de zone, waarin door plotselinge dood alle enzymatische processen hebben opgehouden. Ook bij de fermentatie zal dit zetmeel zonder twijfel er in aanwezig blijven.

De uitkomsten van BEHRENS e.a., welke aan 't einde der drogingsperiode nog koolhydraten meenden te constateeren, omdat er reductie met FEHLING optrad, moeten we betwijfelen. Deze reductie is waarschijnlijk te wijten aan reduceerende verbindingen, welke geen koolhydraten zijn.

¹⁾ Regenachtige namiddag.

²⁾ Vocht-gehalte 35.9%.

MÜLLER vond in zijn met zetmeel overvulde bladen bij den pluk bijna 50 % van 't drooggewicht in den vorm van zetmeelaanwezig. Het suikergehalte bedroeg niet meer dan $\frac{1}{2}$ %. Na 1 dag drogen was het zetmeelgehalte gedaald tot $20\frac{1}{2}$ % en het suikergehalte gestegen tot $5\frac{1}{2}$ %. Het hoeft niet te verwonderen, dat bij deze met zoo abnormaal veel zetmeel gevulde bladen bij de omzetting van het zetmeel den eersten dag zooveel suiker wordt gevormd, dat dit niet alles kan worden verademd. Het suikergehalte was waarschijnlijk zelfs belangrijk grooter dan $5\frac{1}{2}$ %, want dit slaat op de direct reduceerende suiker en het is te verwachten dat er in de eerste plaats saccharose uit het zetmeel zal zijn ontstaan. Het celsap krijgt hierdoor een concentratie aan suikers van meer dan 1 %, hetgeen ons een der andere waarnemingen van MÜLLER—THURGAU doet begrijpen. Hij ziet den eersten dag namelijk vermeerdering van 't zetmeelgehalte in de nerven, en het zijn zonder twijfel de suikers uit 't parenchym, die in genoemde concentratie zooals we weten langzaam diffundeeren en welke daarbij deels in de nerven zijn overgegaan. Deze nerven behouden verder veel langer hun water, zoodat de zetmeelopbouwfunctie nog niet zooals in het gewone parenchym direct afsterft, waardoor de suikertoevoer tot vermeerderde zetmeelvorming aanleiding geeft. Spoedig echter ziet MÜLLER dit zetmeel ook hier weer verdwijnen, wat begrijpelijk is, zoowel door het verademen der suikers, als door het indrogen der nerven en dus het verliezen van de synthetische functie.

Nog een andere waarneming van MÜLLER kunnen we thans verklaren, n.l. waarom het zetmeel het eerst langs de randen verdwijnt, pas later in het centrum van het blad. Het zijn immers de randen, die het eerst uitdrogen, terwijl het middenbladgedeelte met zijn groote nerven veel resistenter tegen de wateronttrekking is (vgl. BEHRENS, pag. 282: „Beim Trocknen verlieren nun zunächst die Blattränder ihr Vegetationswasser; von ihnen schreitet das Welken nach den Mittel-und Seitenrippen fort. Die Mittelrippe bleibt am längsten lebendig”).

Tenslotte eischt het feit, dat in verscheidene door MÜLLER—TH. onderzochte Tabaksmonsters zetmeel voorkwam, terwijl het toch bij de droging had moeten verdwijnen, nadere opheldering. Wij zagen echter, dat bij zéér snelle indroging van het blad, ook de afbraakfunctie van zetmeel zoo spoedig afsterft, dat het tot een volledige omzetting er van niet meer komt. Zoo is langs de plaatsen, waar het blad beschadigd is, hetzij door breken, kneuzen of schimmelaantasting, zooals we reeds vroeger constateerden ook elke omzetting van zetmeel opgehouden. Maar ook chloroformeeren,

114 *Koolhydraten in Tabaksblad bij droging en fermentatie.*

bevriezen maakt, dat later alle omzettingen in het Tabaksblad onmogelijk worden. (Zie b.v. BEHRENS, pag. 284: „Ebensowenig wie in durch Chloroformdämpfe getöteten gehen in erfrorenen Blättern keinerlei Umsetzungen der Kohlenhydrate vor sich”). Nu merkt MÜLLER—THURGAU over de zetmeelrijke tabaksmonsters ook op, dat zij het zetmeel op zeer eigenaardige wijze over het blad verdeeld bevatten, in strepen en lijnen, daarbij „gelangt man unwillkürlich zu der Anschauung, als ob dieselben vielleicht bei oder bald nach der Ernte mehreremal nach verschiedenen Richtungen zusammengeknittert worden wären”. Of zij bevatten het zetmeel gelijkmatig verdeeld; dan hadden zij echter „durchaus das Aussehen von sehr rasch getrockneten Blättern, was sich namentlich in der gelblich grünen Farbe zu erkennen gibt.” Het is uit deze opmerkingen van MÜLLER zeer waarschijnlijk, dat deze bladen door te snelle dood tevens de diastatische functie zoo spoedig verloren hadden, dat zij hun zetmeel in onveranderlijke hoeveelheid ook gedurende de verdere fermentatie behielden.

DER KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL IM LAUB- BLATT VON NICOTIANA TABACUM L.

1. EINLEITUNG.

In seiner „Biochemie der Pflanzen“ sagt CZAPEK (16¹⁾: „Die meisten quantitativen Zuckerbestimmungen in Blättern sind eines grossen Teiles ihres Wertes dadurch beraubt, dass auf Tageszeit, Temperatur und andere die Assimilationstätigkeit beeinflussende Elemente in den Resultaten nicht Rücksicht genommen wurde“. Die Vorgänge bei der Stärkehydrolyse und dem weiteren Kohlenhydratenstoffwechsel sind von SACHS (76) und SCHIMPER (78), etwas später auch von BROWN und MORRIS (10) im Jahre 1893 zum ersten Male eingehend studiert worden. Und wir dürfen sagen, dass auch jetzt noch unsere Ansichten über diese Vorgänge sich hauptsächlich stützen auf jenen Untersuchungen. Wenn wir nun ins Auge fassen, dass genannte Autoren dabei den äusseren Einflüssen wie Temperatur, Feuchtigkeit und Belichtung, sowie der Vorbehandlung keine Rechnung getragen haben, schien es nicht ohne Bedeutung einen Teil dieser Versuche mit Pflanzen, welche derselben Vorbehandlung ausgesetzt waren, zu wiederholen.

Schon Miss MATTHAEI (47) fand bei ihren Assimilationsversuchen, dass die Vorbehandlung auf die Ergebnisse einen grossen Einfluss ausübte und sie sagte: „Thus it is not sufficient to place plants under constant conditions, their whole previous treatment must also have been similar.“ Auch bei der Stärkeumwandlung ist leicht zu beweisen, dass jüngere Blätter sich anders verhalten als ältere, kürzer verdunkelte anders als länger verdunkelte Blätter, und dass z. B. die Feuchtigkeit, woran die Blätter vor dem Versuche ausgesetzt waren die Stärkebildung aus Zuckerlösungen, sowie die Umwandlungsfähigkeit derselben vollkommen änderte.

Es ist nun auch völlig deutlich, warum SACHS bei *Tropaeolum* fand, dass „ganz gleichartig aussehende Blätter eines und desselben Sprosses sich doch ganz verschieden verhalten; das eine war an Stärke reich zu derselben Zeit, wo das andere Stärkearm oder sogar Stärkefrei war“. Ich habe dasselbe wiederholt bei im Freien wachsenden Pflanzen nachgewiesen und auch JUL. MOHR (53) und COSTERUS (14) haben es in Niederl. Indien gefunden.

SACHS beabsichtigte festzustellen wie die Ableitung der Stärke mit der Temperatur zusammenhängt; er schloss dabei aus der Abwesenheit von

¹⁾ Die eingeklammerten Zahlen beziehen sich auf das Literaturverzeichnis (Seite 138).

Stärke in einigen Blättern bei sehr hoher Sonnentemperatur, auf schnellere Ableitung bei höherer Temperatur. Es ist nach meinen Erfahrungen jetzt wohl sicher, dass die Ursache der Stärkeabwesenheit hier nicht der Ableitung sondern ganz anderen Ursachen zugeschrieben werden muss. Die starke Besonnung hat wahrscheinlich eine geringe Austrocknung hervorgerufen, und wir wissen jetzt aus den Untersuchungen von THODAY (85), dass dieses sehr bald zum Schliessen der Spaltöffnungen führt, was die Assimilation und zugleich die Stärkebildung, herabsetzt. Daneben hat schon eine geringe Austrocknung, wie wir sehen werden, einen unmittelbaren Einfluss auf das Stärke-Zucker-Gleichgewicht, wobei jenes Gleichgewicht sich stark in der Richtung von Zuckerbildung und Stärkeabbau verschiebt. Wenn wir nun daran denken, dass in Europa die Temperatur, Feuchtigkeit, u.s.w. stündlich wechseln, so zeigt sich die Notwendigkeit das Problem unter mehr einheitlichen Verhältnissen zu studieren. Behalten wir nämlich jetzt im Auge, dass im Laubblatt zugleich neben einander stattfinden: Bildung von Assimilaten (Zuckerarten, Tannine, Eiweiss, u.s.w.), Ableitung der organischen Substanzen, Wachstum und Atmung, welche jede vielleicht anders von den äusseren Verhältnissen beeinflusst werden, so wird es deutlich:

a. dass die Zu- oder Abnahme einer einzigen Verbindung (wie bei SACHS die Stärke) nichts ausweist über eine vermehrte oder verzögerte Tätigkeit einer der anderen Faktoren (bei SACHS Assimilatenableitung);

b. dass bei dieser Verwickeltheit das Auffinden von bestimmten Gesetzmässigkeiten nur möglich ist, wenn wir die Pflanzen einer gleichmässigen Vorbehandlung aussetzen und wenn wir auch weiter arbeiten unter besser beherrschten Verhältnissen und mit Blättern desselben Alters. Sonst gelingt man, wie SACHS zu falschen Schlüssen.

Dass ein bestimmter Zusammenhang zwischen Zucker und Stärke in der Pflanze existiert, geht hervor aus zwei bekannten und einfachen Versuchen. Erstens zeigt sich, dass Blätter im Dunkeln um so mehr Stärke bilden je höher die Zuckerkonzentrationen sind (bis zu einer Grenzkonzentration) worin man sie gelegt hat. Zweitens sehen wir, wenn wir Blätter mit dem Negativ einer fotografischen Platte bedecken, dass an den Stellen, wo das meiste Licht hindurchgeht und wo infolge dessen auch die stärkste Assimilation stattfindet, auch die meiste Stärke sich bildet. (Jodprobe SACHS; vgl. MOLISCH (55)).

Es *scheint* jedoch oft, dass ein derartiger Zusammenhang fehlt, z.B. findet sich in „Zuckerpflanzen“ nur wenig Stärke und umgekehrt. Wir müssen aber vor Allem daran denken, dass es sich hier nicht um ein einfaches chemisches Gleichgewicht handelt, sondern dass Enzyme sich daran beteiligen, welche von Licht, Temperatur, Feuchtigkeit, Salzen leicht beeinflusst werden. Der Aufbau von Stärke aus Zucker ist ausserhalb der Pflanze nicht möglich, aber auch aus der Überlegung, dass $(C_6H_{10}O_5)_n + n H_2O = n C_6H_{12}O_6$, obwohl eben *Wasserentziehung* die *Stärkehydrolyse* (!) begünstigt (wie wir sehen werden), geht sofort hervor, dass man dieses Zucker-Stärke-System nicht einfach chemisch auffassen kann, sondern dass man auch enzymatische Vorgänge zur Erklärung heranziehen muss.

2. DAS AUFZIEHEN DER VERSUCHSPFLANZEN. DIE METHODE DER QUANTITATIVEN MONOSEN-, SACCHAROSE-, MALTOSE- UND STÄRKEBESTIMMUNG IN PFLANZENMATERIAL.

Ich habe meine Versuche hauptsächlich mit *Nicotiana tabacum* L. ausgeführt, weil sie eine bedeutende Kulturpflanze ist und sich leicht unter den Laboratoriumsverhältnissen zu normalen Pflanzen aufziehen lässt. Weiter können mit den jungen Pflanzen sehr gut Assimilationsversuche ausgeführt werden, weil die ersten Blätter horizontal stehen und das senkrecht Aufwerfen eines Lichtbüschels möglich wird; auch verlieren die Blätter in Alkohol leicht die Chlorophyllfarbstoffe; von grosser Bedeutung ist auch, dass die Stärke an Vorder- und Hinterseite ungefähr ebenso schnell schwindet, was z.B. für *Tropaeolum*, womit die meisten Forscher gearbeitet haben und darum auch gerne von mir für die Versuche verwendet worden war, nicht der Fall ist. Wie schon SACHS nachgewiesen hat, verliert die Hinterseite viel langsamer die Stärke als die Vorderseite, und handelt es sich hier folglich um zwei Gewebe (Palissaden und Schwammparenchym), welche sich was den Kohlenhydratstoffwechsel betrifft verschieden verhalten. Bei der chemischen Analyse erhält man darum immer das Resultat eines Gemisches zweier Systeme, was doch nicht erwünscht ist.

Die Tabakspflanzen einer „Ameronger“-Varietät wurden im Gewächshaus bei 22° C. und grosser Feuchtigkeit in den Monaten Februar-März und September-Oktober aufgezogen, und für die Versuche verwendet wenn 4 kleine normale Blätter anwesend waren. Die Pflanzen standen dabei in Töpfen wobei die Wurzeln sich völlig entwickeln konnten. Unter diesen Verhältnissen bildeten die Blätter soviel Stärke, dass wenn sie Nachmittags um 4 Uhr im Dunkeln bei 28° C. gebracht wurden, den nächsten Morgen um ungefähr 10 Uhr gerade stärkeleer waren. In diesem Augenblick wurden die Blätter für Assimilations- und andere Versuche verwendet und war die Vorbehandlung also für alle Blätter die gleiche gewesen. Im Sommer wurde viel mehr Stärke gebildet und war diese den nächsten Morgen noch nicht verschwunden, weil die Verhältnisse dann ganz anders lagen. Darum wurden nur in obengenannten Monaten die Versuche ausgeführt, das Material gesammelt, aufbewahrt und in den anderen Monaten im Chemischen Laboratorium analysiert.

DAS TROCKNEN UND EXTRAHIEREN DER BLÄTTER.

Wie WATERMAN (94, 95, 96) für Kartoffeln nachgewiesen hat, können beim Trocknen energische Veränderungen im Stärkegehalt auftreten, welcher auf Kosten der Saccharose abnimmt. Etwas Ähnliches geschieht auch, wie wir erwarten können, beim Trocknen der Blätter. CAMPBELL (12), DAVIS und DAISH (18), sowie GAST (27) haben die Notwendigkeit betont die Enzyme bevor dem Trocknen mit Wasserdampf, Chloroform oder Alkohol zu töten. Nur PARKIN, der mit *Galanthus nivalis* arbeitete, meinte dass dies nicht notwendig war. Die Blätter dieser Pflanze enthalten aber keine Stärke, was das abweichende Ergebnis erklärt.

Es wurde darum von mir das gesammelte Blattmaterial zuerst gewogen (Frischgewicht), dann mit kochendem 96 % Alkohol übergossen (und etwas Ammoniak gegen ev. Saccharoseinversion), und getrocknet

bei 100° C. bis Gewichtskonstanz (Trockengewicht). Dann konnte die Flasche mit diesem Blattpulver sterilisiert und aufbewahrt werden.

Bei der chemischen Analyse wurde drei Mal mit kochendem Wasser nach vorherigem Zusatz von etwas BaCO_3 extrahiert, in der Weise von SCHROEDER UND HORN benutzt. Dann wurde ausgewaschen, und in dem im Filter zurückgebliebenen Blattpulver konnte die Stärke bestimmt werden; in den zusammengeführten Filtraten der Zucker.

DIE WEITERE BEHANDLUNG DES BLATTEXTRAKTES.

Es ist absolut notwendig das Extrakt zu reinigen, um die Verbindungen, welche keine Kohlenhydraten sind, aber wohl Kupferlösung reduzieren zu entfernen (Glykosiden, organ. Säuren). Dies kann geschehen mit basischem Bleiacetat, wenn man dafür sorgt, dass: *a.* man es nicht in Überschuss verwendet; *b.* nicht bei hoher Temperatur arbeitet; *c.* sofort nach Filtrieren den Überschuss an Blei mit etwas Na_2CO_3 entfernt. DAVIS wies nach, dass das basische Bleiacetat mit Fruktose keinen Niederschlag bildet, sondern ebenso wie unter Einfluss von Bleihydroxyd übergeführt wird in Glucose, die nur die Hälfte des Reduktionsvermögens der Fruktose besitzt und optisch inaktiv ist. Wenn man wie oben angegeben verfährt, findet diese Umwandlung nur sehr langsam statt; auch PARKIN (63) sagt, dass wenn man es nicht in Überschuss zufügt „it has no appreciable effect on the sugar estimations“.

Das in dieser Weise nach mehrmaligem Auswaschen erhaltene Extrakt, wurde bis auf 100 cc. eingedampft; 40 cc. wurden sofort auf ihr Reduktionsvermögen geprüft; in 25 cc. wurde die Saccharose invertiert; in 25 cc. überdies noch die Maltose (Bestimmungen in duplo). Die Inversionsmethoden fordern eine genaue Prüfung, weil sie oft Ursache falscher Ergebnisse sind. Zuerst werde ich aber besprechen die

METHODE ZUR BESTIMMUNG DER REDUZIERENDEN ZUCKERARTEN NACH BANG.

Für die für Glukose ausgearbeitete Methode muss ich nach BANG (2) verweisen. Weil Fruktose ungefähr das gleiche Reduktionsvermögen hat wie Glukose, ist durch Saccharose-Inversion aus der Reduktionszunahme auch die Menge Saccharose zu berechnen. Weil Maltose weniger reduziert wie die Monosen, würde man nach Maltose-Inversion aus der Zunahme auch die Maltose und die Monosenmengen bestimmen können, sobald jedenfalls eine Maltosetabelle für die BANG'sche Methode empirisch ausgearbeitet ist. Die von mir erhaltene Tabelle für Maltose findet man auf Seite 13, wobei das Titrieren von Iodium so lange statt fand, bis die dunkelblaue Farbe sich 15 Sekunden hielt. Man kann beweisen, dass man in dieser Weise nur 80 % des reduzierten Kupfers oxydiert hat, bei Glukose (Tabelle BANG's; auch von mir nachgeprüft) 90 %. Theoretisch ist dies von Interesse, es beweist, dass die Reduktion ein verwickelter Prozess ist und dass wir bei den auf empirischen Grundlagen stützenden Zuckerbestimmungen uns peinlich genau an der Vorschrift halten müssen.

DIE INVERSION DER SACCHAROSE.

Die Methode, bei 70° C. zu invertieren mit HCl nach Herzfeld's Angaben ergibt nach DAVIS und DAISH unrichtige Ergebnisse. Ihrer Mei-

nung nach muss man arbeiten mit schwachen Säuren, wie Oxal- und Citronensäure, weil sonst auch ein Teil der Maltose zu Glukose hydrolysiert wird. Schon KLUYVER (40) hat festgestellt, dass die Meinung von DAVIS c.s. nicht richtig ist. Sie geben selber an, dass von reiner Maltose erst nach 2 Stunden mit Herzfeld's Methode 29 % invertiert ist. Weil man nach H. aber nur 5 Min. zu invertieren braucht, um alle Saccharose umzuwandeln, kann dann nur noch sehr wenig Maltose invertiert sein. Ich habe dies mit Versuchen nachgeprüft, und gefunden, dass es bei kleinen Zuckermengen auch unmöglich ist eine Zunahme infolge Maltose-Inversion festzustellen.

Ob man Citronensäure oder Salzsäure verwendet, wenn man nur eine bestimmte H-Ionenkonzentration dabei verwendet, geschieht die Inversion in derselben Weise. Es ist aber der Säurerest, welcher bei der Reduktion noch Einfluss auf das richtige Ausfallen der Bestimmungen ausüben kann. Es zeigt sich heraus, dass nach Neutralisation mit Na_2CO_3 das gebildete Natriumcitrat Kupfer reduziert, was bei Bestimmungen von 0.01 % bis 0.1 % Zucker zu Fehlern von 10 % bis 100 % führt, bei Konzentrationen von 1 % Zucker, zu Fehlern von ungef. 1 %. Nun erhalten DAVIS und DAISH auch wirklich im Durchschnitt 1.2 % zu hohe Ergebnisse, was von ihnen aber noch gedeutet wurde als „Slight hydrolysis had occurred“.

Es zeigt sich hieraus, dass man für die Bestimmung von geringen Quantitäten Zucker bei der Inversion mit 2.5 % Salzsäure während 5 Minuten bei 70° C. gute Resultate erhält, während die von Davis und Daish dafür angegebene Methode mit Citronensäure zu unrichtigen Ergebnissen führt.

DIE MALTOSE-INVERSION.

Wenn man 3 Stunden kocht mit $\frac{1}{1}$ N HCl wie BROWN und MORRIS, oder sogar wenn man dies während einer halben Stunde tut, wie SCHROEDER, HORN und AHRNS (81, 82, 1) werden, wie DAVIS und DAISH gefunden haben sehr grosse Quantitäten (bis ungef. 100 %) der Fruktose destruiert, und infolge dessen auch 50 % der Saccharose. Bei der Berechnung der Zuckerquantitäten findet man dadurch nicht nur zu wenig Zucker, sondern auch das Verhältnis der Maltose zur Monosen wird ganz und gar unrichtig.

Ich habe das Ergebnis von DAVIS und DAISH auch für Konzentrationen von 0.1 % und 0.01 % Saccharose als Tatsache nachgewiesen. Ich habe weiter nach einer Inversionsmethode gesucht, welche die Maltose wohl invertiert, aber die Fruktose und dadurch auch die Saccharose (nach Inversion) nicht angreift. Wenn man 24 Stunden mit 2.5 % HCl auf 70° C. erwärmt, findet man von der Saccharose 95—98 % zurück, während man für die Maltose 94—95 % der theoretischen Quantität (wenn alles invertiert worden wäre) erhält. Die Fehler, welche man hierbei macht, sind bei den geringen Quantitäten (einige mGr.), welche ich untersuche von keiner Bedeutung. Überdies wurde bei der Berechnung noch damit gerechnet, dass nur 95 % und nicht 100 % der Maltose als Monose zurückgefunden wird.

Ich habe noch nachgewiesen, dass das Arbeiten mit Fenolftaleine, als Indikator, wie DAVIS und DAISH dies machen, zu falschen Ergebnissen führt, besonders wieder wenn man mit geringen Zuckerquantitäten arbeitet, weil schon einige Tropfen stark reduzieren. Wie ich zeigte, kann man Methylrot als Indikator verwenden.

Auf Seite 21 ist als Beispiel eine Zuckerbestimmung (Monose, Saccharose, Maltose, neben einander), sowie das Verfahren bei der Berechnung wiedergegeben.

DIE QUANTITATIVE STÄRKEBESTIMMUNG.

Einige Male war es wünschenswert die Stärkebestimmung mit der Jodprobe durch eine quantitative Bestimmung zu ergänzen. Wie DAVIS und DAISH (19) zeigten kann man für diese Bestimmung nicht gewöhnliche Malzdiastase verwenden. Es entsteht dabei nämlich aus der Stärke Dextrin und Maltose. Dextrin wird nun bei der nachfolgenden Reinigung mit Bleiacetat von anderen Niederschlägen adsorbiert und aus der Flüssigkeit entzogen, wodurch diese Stärkebestimmung zu niedrige Resultate liefert. Wenn man mit Takadiastase arbeitet entstehen Maltose und Glukose als Abbauprodukte, und können wir den gebildeten Zucker genau so weiter behandeln, wie die Zuckerlösungen. Ich kochte schliesslich 3 Stunden mit $\frac{1}{1}$ N HCl (keine Fruktose und Saccharose anwesend), wodurch auch alle Maltose zu Glukose invertiert wird. Man soll noch darauf achten, dass Malzdiastase sowie Takadiastase auch selber Zucker enthalten (Blankoversuch und den erhaltenen Wert in Rechnung tragen!) was von DAVIS nicht bestimmt wurde. 100 mGr. Takadiastase wird an die verkleisterte Stärke aus dem im Filter hintergebliebenen Blattpulver zugefügt und 24 Stunden bei 38° C. gelassen.

Eine Bestimmung mit reiner Stärke lieferte 96.5 % der theoretisch anwesenden Stärke.

DIE GENAUIGKEIT DER KOHLENHYDRATENBESTIMMUNGEN IN PFLANZENMATERIAL.

Es ist deutlich, dass die Ergebnisse, erhalten durch Bestimmungen, wobei das Blatt getrocknet wurde ohne bevor die Enzyme zu töten (BROWN und MORRIS (10)), oder wo die Reinigung des Extrakts mit bas. Bleiacetat hinterblieb keine grosse Genauigkeit beanspruchen können (MÜLLER—THURGAU, 56, 57, 58). Die Maltose-Inversion mit $\frac{1}{1}$ N Salzsäure während $\frac{1}{2}$ oder 3 Stunden, beeinträchtigt die Ergebnisse für Saccharose nicht, das Verhältnis zwischen Fruktose, Glukose und Maltose wird dadurch aber unrichtig. (BROWN und MORRIS (10), SCHROEDER, HORN und AHRNS, (81, 82, 1). Ich habe diese Fehler hauptsächlich beseitigt. Es bleibt immer noch möglich, dass reduzierende Verbindungen, welche nicht von Bleiacetat gefällt werden und keine Zucker sind, meine Ergebnisse stören. Die Methode ist aber im Stande bestimmte Gesetzmässigkeiten zum Vorschein zu bringen, und hat sich also vorläufig als brauchbar erwiesen.

3. ALLGEMEINE BETRACHTUNGEN ÜBER DAS VORKOMMEN, VERSCHWINDEN UND BILDEN VON STÄRKE IM TABAKSBLATT.

DE TONI und PAOLETTI geben eine Beschreibung und Figuren der anatomischen Bau des Tabaksblattes (86).

Die Bildung von Stärke geschieht durch die Leukoplasten (die Chloroplastiden SCHIMPER (77)). Wie WINKLER (101) zeigte, hat dieses Vermögen wenig mit den von den Leukoplasten oft adsorbierten Farbstoffen (z. B. Chlorophyllfarbstoffen) zu schaffen. Die Stärkebildung ist auch in chlorotischen Pflanzen aus Zuckerlösungen zu bewirken. Und auch in gelben Blättern, worin die Leukoplastenkörper noch intakt waren, fand er dieselbe Stärkebildung wie in grünen Blättern. In unterirdischen Organen mit farblosen Leukoplasten ist das Stärkebildungsvermögen, wie wir ausserdem wissen oft sehr gross (Kartoffel).

Ein Blatt von Tabak, das stark assimiliert hat, sieht nach der Jodprobe egalschwarz aus, nur die grösseren Nerven erscheinen weiss. Mikroskopisch beobachtet man, dass die Leukoplasten dieser Zellen wohl Stärke gebildet haben, aber die Anzahl der Leukoplasten darin ist sehr klein.

Wenn wir nun im Dunkeln die Stärke teilweise verschwinden lassen, bekommt man äusserlich das folgende Bild. Die Stärke im Mesophyll bleibt hauptsächlich den grösseren Nerven entlang am längsten anwesend, auch die feinen Nervenenden bleiben lange schwarz aussehen. Ersteres werde ich später erklären, das zweite wird verursacht durch die sogenannte „Stärkescheide“, welche bei den Nervenenden an die Blattoberfläche tritt, um schon etwas weiter von vielen Reihen in der Längsrichtung gestreckten grossen parenchymatischen und leukoplasma-armen Rinden-zellen umgeben zu werden. Auch im Stiel findet man die Stärkescheide noch sehr lange schwarz, aber äusserlich ist dies nicht wahrzunehmen. Die wenigen Leukoplasten in diesem Rindenparenchym behalten (mikroskopisch) auch länger ihre Stärke, als das übrige Parenchym.

Was ist die Ursache des langdauernden Stärkereichtums dieser Stärkescheide und dieses Rindparenchyms? SACHS und PFEFFER meinten zuerst, dass es eine Folge einer überwiegenden Anziehungskraft für Zucker war, warum sie diese Scheide als „Stärkestrasse“, „Stärkebahn“ kennzeichneten. SCHIMPER (78) nimmt auch bei Legen in Zucker bei Hydrocharisblättern die erste Stärke in der „Leitscheide“ (= Rindenparenchym) war und schliesst daraus, dass diese Scheide, als Transportbahn angesehen werden muss. Ich werde beweisen, dass die Ursache nicht in einer grösseren Anziehungskraft der Zellen sondern in einer grösseren synthetisierenden Kraft der Leukoplasten zu suchen ist. Und es geht daraus dann hervor wie spekulativ die Deutungen SCHIMPERs gewesen sind. Denn wenn die Leukoplasten der Stärkescheide schon geringe Quantitäten Stärke festhalten, werden sie doch für den Zuckertransport sehr ungeeignet sein.

Schon HEINE (30) hat darauf hingewiesen, dass wenn man die Stärkescheide durchschneidet das Wachstum weiter geht. Auch hat er Viciapflanzen solange im Dunkeln gestellt, bis auch die Stärke aus dieser Scheide verschwunden war, darauf einen Teil des Stengels mit Stanniol umwickelt und belichtet. Überall bildete sich dann Stärke, mit Ausnahme des unwundenen Stengelteils, und hier auch nicht in der Stärkescheide. Von einer grossen Anziehungskraft des Zuckers aus der Umgebung zeigt sich hier gar nichts. Genau dasselbe habe ich für Tabak festgestellt. Wenn man sie aber direkt belichtet (und auch aus Zuckerlösungen), immer bildet sich die erste Stärke in den Leukoplasten des Rindenparenchyms. Es ist unmöglich dies durch eine Anziehungskraft zu erklären. Wenn wir Stärkefreies Rindenparenchym belichten mit 24000 M.K. bei 28° C. kann man nach 3 Minuten schon mikroskopisch Stärke darin wahrnehmen. Ver-

dunkelt man aber einen Teil der Leitscheide und belichtet den Rest des Blattes einige *Stunden*, dann kann man im verdunkelten Teil keine Stärke antreffen. Obwohl eine sehr geringe Quantität Zucker also zur Stärkebildung ausreicht, ist dann aus der einige Stunden belichteten Umgebung noch nicht soviel zugeströmt, dass Stärke sich gebildet hat. Wir müssen aus der eheren Stärkebildung in Zuckerlösungen und bei Assimilation, annehmen, dass die Leukoplasten des Rindenparenchyms, der Stärkescheide, aber auch der Schliesszellen und des Mesophylls in der Umgebung der grösseren Nerven eine grössere synthetisierende Kraft besitzen als die des übrigen Parenchyms. Etwas Ähnliches, wie zwischen den Geweben in einer Pflanze, trifft man ja auch an zwischen verschiedenen Pflanzen („Zucker“- und „Stärkepflanzen“). Neben einander müssen wir Aufbau und Hydrolyse von Stärke annehmen; das Verhältnis der Enzymmengen, welche beide Prozessen beherrschen, bestimmt die kleinere oder grössere synthetisierende Kraft der verschiedenen Geweben und der verschiedenen Pflanzen.

4. EINIGE VERSUCHE ÜBER DEN EINFLUSS DER VORBEHANDLUNG AUF DEN KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL IM TABAKSBLATT.

Als ich Versuche anstellte mit blühenden Tabakspflanzen, welche Nachmittags im Dunkeln bei 9°, 17° und 28° C. gebracht wurden, zeigte sich, dass die Sandblätter am längsten ihre Stärke behielten, dann kamen die Mittenblätter, während die obersten Blätter die Stärke zuerst verloren hatten. Auch die chemische Analyse dieser drei Blattarten Nachmittags um 5 Uhr erwies, dass der Kohlenhydratenstoffwechsel in diesen Blättern nicht die gleiche sein konnte. Die Blätter enthielten pro 1 Gram Trockengewicht an

	Gesamtzucker als Glukose	wovon Saccharose
Sandblatt	8 mGr.	3 mGr.
Mittenblatt.....	16 mGr.	10 mGr.
Oberste Blätter	25 mGr.	22 mGr.

Daraus war es schon deutlich, dass es erwünscht war mit mehr einheitlichem Blattmaterial zu experimentieren; daher beschloss ich nur mit den ersten normalen jungen Tabaksblättern meine Versuche anzustellen, wodurch der Altersunterschied eliminiert war.

Aber auch dann konnte ich feststellen, dass die Blätter sich der Stärkebildung gegenüber ganz verschieden verhalten, wenn wir die Vorbehandlung etwas variieren. Schon BROWN und MORRIS (10) zeigten, dass abgeschnittene Blätter weniger Stärke bilden bei der Assimilation als übereinstimmende Blätter an der Pflanze. Auch ich habe das festgestellt für Tabak. Zweitens erwies sich, dass wenn die Blätter vor dem Assimilationsversuch einer Austrocknung ausgesetzt worden waren, die Stärkebildung auch weniger ausgeprägt war als bei feucht aufgezogenen Blättern.

Und schliesslich konnte ich auch wahrnehmen, dass die Zeit der vorherigen Verdunklung Einfluss auf die Stärkebildung durch Assimilation ausüben kann.

Wie ich angegeben habe, waren meine Versuchspflanzen nach einer bestimmten Vorbehandlung Morgens um 10 Uhr eben Stärkeleer. Sie hatten dann 18 Stunden im Dunkeln bei 28° C. verweilt. Darauf wurden sie mit 24000 M.K. belichtet (28° C.) und die Stärkebildung mittels der Jodprobe von Zeit zu Zeit verfolgt. Dasselbe geschah mit Blättern, welche nicht 18 Stunden, sondern 42 und 90 Stunden bei 28° C. im Dunkeln verweilt hatten, worauf dieselbe Belichtung anfang. Es wurde bestimmt wenn einige Stadia: I (die ersten Stärkekörner eben im Mesophyll zu sehen), II und III erreicht wurden:

Nach 18 Stunden Verdunklung bei 28° C. und auffolgender Be- lichtung	Stad. I nach	Stad. II nach	Stad. III nach
.....	5 Min.	10 Min.	15 Min.
Nach 42 Stunden	10 Min.	22.5 Min.	30 Min.
Nach 90 Stunden	17.5 Min.	30 Min.	45 Min.

Man sieht hieraus wie verschieden die Stärkebildung fortschreitet nach verschiedener Vorbehandlung¹⁾. Die Erklärung dieser Erscheinung ist wahrscheinlich zu suchen in dem Schliessen der Schliesszellen bei längerer Verdunklung. Jedenfalls ersieht man wie gross der Einfluss der Vorbehandlung ist, und wie wenig Blätter der im Freien wachsenden Pflanzen sich für derartige Versuche eignen. Wodurch auch die Ergebnisse SACHS' (76) ebensowenig etwas aussagen über den Einfluss der Temperatur über die Stärkeableitung, wie die Versuche KREUSLERS über den Einfluss der Temperatur auf die Assimilation. Und wir können für die Versuche von SACHS wiederholen, was MATTHEAI über die Ergebnisse KREUSLERS sagt: „His results are not in the least the expression as he conceived them to be, merely of the effect of the temperature, but are the outcome of the most various causes, so complicated, that it is impossible to extricate from them the simple temperature-effect.“

5. VERSUCHE ÜBER DIE BILDUNG VON STÄRKE BEI 28° C. DURCH ASSIMILATION.

Wie wir sahen bildet sich in den Leukoplasten der Palissadenparenchymzellen nach 5 Minuten schon Stärke. Ich habe die Angaben GILTAYS über die Assimilationsstärke für meine Verhältnisse ungefähr umgerechnet. Dann ist die Trockengewichtszunahme während dieser 5 Minuten ungefähr 0.5 mGr. pro 5 Gram Frischgewicht oder ungef. $\frac{1}{4}$ Gr. Trockengewicht. Wenn Alles als Zucker assimiliert wird, bedeutet dies eine Konzentrationserhöhung (auf das Wasser im Blatt berechnet) von 0.01%! Jedenfalls ist also eine äusserst geringe Zuckerzunahme im Stande die Leukoplasten zur Stärkebildung zu veranlassen.

Wenn wir ein Tabaksblatt 3 Tage belichten, einen Teil aber zwischen Hauptnerv und Blattrand mit schwarzem Papier bedecken, nimmt im belichteten Blattteil die Stärke fortwährend zu, im verdunkelten Teil aber trifft man keine Stärke an, mit Ausnahme einer schwachen

¹⁾ Man betrachte für die verschiedene Stärkebildung, die bei ungleicher Vorbehandlung auftritt Abbildung 2.

Stärkebildung in einigen mM. des unbelichteten Teiles des Rindenparenchyms. Im übrigen verdunkelten Parenchym findet man aber keine Stärke. Wenn auch im Dunkeln die Leukoplasten (z. B. aus Zuckerlösungen) Stärke bilden können, muss man annehmen, dass noch nicht soviel Zucker in das unbelichtete Gewebe hineingeströmt ist, dass eine Konzentrationserhöhung von ungefähr 0.01 % erreicht worden war! *Dies beweist, dass Zucker keine bedeutende Rolle bei dem Transport spielt und zweitens, dass die im Tabaksblatt vorhandene Stärke dort nicht transitorisch entstanden ist.* Dass die Leukoplasten der dem belichteten Teil direkt anliegenden Rindenparenchymzellen noch etwas Stärke gebildet haben, erklärt sich aus den grösseren synthetisierenden Kraft dieser Leukoplasten, wobei eine noch geringere Zuckerzufuhr (als 0.01 %) ausreicht um Stärke zu bilden.

Wenn die jungen Tabaksblätter nach 18-stündigen Verweilen im dunkeln Raum bei 28° C. gerade stärkefrei waren enthielten sie nur 2 bis 3 mGr. Zucker pro 10 Gram Frischgewicht. Das war das Ergebnis mehrerer Versuche. Wurde nun 11 Stunden belichtet mit 24000 M.K. bei 28° C., so ergab die Analyse, dass die Zuckermenge pro 10 Gram Frischgewicht bis 5 mGr. gestiegen war, die Stärke bis 103 mGr. (ausgedrückt als Glukose), während das Trockengewicht von 530 bis 740 mGr., also mit 210 mGr. zugenommen hatte, wovon auf die gesamten Kohlenhydrate also 105 mGr. entfielen. Es zeigt sich hieraus: a. *dass auch bei starker Assimilation nur wenig in der Form von Zucker anzutreffen ist; ein grosser Teil der assimilierten CO₂ wird direkt zu Stärke synthetisiert; b. das Fehlen des Zuckers im stark lebenden Blatt beweist, dass der Zucker dort keine Funktion im Stofftransport erfüllt, sonst müsste er doch in einigermaßen bedeutender Konzentration vorkommen; c. es werden direkt bei der Assimilation noch andere Stoffe als Kohlenhydrate gebildet; es ist nicht unmöglich, dass hierunter, die Verbindungen sich befinden, welche transportiert werden.*

6. VERSUCHE ÜBER DIE STÄRKEBILDUNG BEI 28° C. AUS ZUCKERLÖSUNGEN.

Dass Blätter, welche auf Zuckerlösungen treiben im Dunkeln Stärke bilden können, wurde zuerst von BOEHM (9) festgestellt. ARTH. MEYER (49) sah, dass die Stärkebildung aus vielen Verbindungen geschieht; CZAPEK (15) und LIDFORSS (42) studierten diese Stärkebildung bei niedriger Temperatur; WINKLER (101) beschäftigte sich mit Versuchen über den Einfluss der Konzentration auf die Stärkesynthese. Doch besteht ein systematisches Studium über die Stärkebildung in ihrer Abhängigkeit der Temperatur und Konzentration nicht, und wir wissen quantitativ noch gar nichts über diese Frage. Ich habe einige systematischen Versuche über die quantitative Stärkebildung in Tabaksblättern angestellt, sowie bei einigen anderen Pflanzen (*Tropaeolum*, *Phaseolus*, *Sinapis*, *Prunus laurocerasus*) die Bildung mittels der Jodprobe verfolgt. Es wurden für diese kolorimetrische Stärkebestimmung Platten mit bestimmten Zuckerlösungen bei Temperaturen von 1½°, 12°, 17° und 28° C. gestellt und dann später Blattstücke, welche eben stärkefrei waren (Morgens 10 Uhr) mit der Unterseite auf die Lösungen gelegt, wobei im Blatt Schnitte angebracht wurden, damit der Zucker besser in das Blatt hinein-

dringen konnte. Es wurde die Stärkebildung von Zeit zu Zeit bestimmt, und es zeigte sich, dass das Endresultat der Starkeanhäufung bei den verschiedenen Zuckerkonzentrationen bei Temperaturen 12°, 17° und 28° C. dasselbe war. Die Schnelligkeit der Stärkebildung aber war bei den verschiedenen Temperaturen nicht die gleiche; diese Bildung schreitet in 1 Tag bei 28° ungefähr ebenso schnell fort, wie bei 17° C. in 2 Tagen und bei 12° C. in 3 Tagen. In Abb. 3 ist diese Erscheinung ersichtlich. Die Blätter wurden nun 2 Tage bei 28° C., 4 Tage bei 17° C., eine Woche bei 12° und 4 Wochen bei 11½° C. auf den Zuckerlösungen gelassen. Dann war das Endresultat sicher erreicht. Die Blätter sahen auch dann noch frisch aus; war Pilzschädigung eingetreten, so wurde der Versuch wiederholt.

Das erste, was mir auffiel war, dass niemals Stärke gebildet wurde in den ungefähr 6—10 Zellenreihen der Schnittfläche. Auch auf der Fotografie (Abb. 3) kann man diese Erscheinung noch beobachten. Es wäre möglich, dass infolge des Wundreizes Abbauenzyme gebildet waren. Dass dies aber nicht der Fall ist, wird deutlich, wenn wir beobachten, dass stärkereiche Blätter im Dunkeln gestellt ihre Stärke verlieren mit Ausnahme in den Zellen dem Schnitte entlang. Abbauenzyme waren also nicht gebildet, sondern es wird deutlich, dass in diesen Zellen gar keine Umsetzungen mehr stattfinden und aus der mikroskopisch zu beobachtenden Koagulation des Plasmas geht hervor, dass durch die Quetschung die Zellen getötet worden sind, ebenso wie dies z.B. durch Alkohol geschieht. Überall kann man so im Blatt die Stärkebildung und Abbau durch Druck vermeiden. Ohne eine Erklärung davon zu geben ist das nicht Schwinden der Stärke in Blättern den Schnitten entlang, von vielen Forschern veröffentlicht worden (z.B. MOLISCH (54), SCHROEDER UND HORN (82); und MÜLLER—THURGAU (57) in trocknen zusammengeknitterten Tabaksblättern). Bei der weiteren Betrachtung werden wir uns von dieser getöteten Zone abstrahieren. Die Stärkebildung wird für die Temperaturen 12°, 17° und 28° C. zusammen besprochen, weil dort das Endresultat dasselbe ist. Es zeigt sich (Abb. 4, 6):

1. die Stärkebildung findet bei Zuckerkonzentrationen von ½—4 % nur direkt an der Schnittfläche statt;
2. sie ist maximal bei 7½ % Glukose und 14% Saccharose;
3. bei 14 und 24 % Glukose sowie bei 24 und 40 % Saccharose ist sie wieder zurückgegangen.

Ich habe festgestellt, dass dies damit zusammenhängt, dass *Plasmolyse die Stärkebildung entgegen wirkt*. Dass bei ½—4 % Zucker nicht im ganzen Blatte Stärke gebildet wird, findet zweifellos darin seinen Grund, dass der Zucker nicht eingedrungen ist um die erwünschte (wie wir wissen sehr geringe Konzentrationserhöhung) zu erzielen. Hieraus geht wieder deutlich hervor, dass der Zucker sich von Zelle zu Zelle ausserordentlich schwierig fortbewegt, und dass im Blatt der Zuckertransport von keiner Bedeutung sein kann, wie ich auch in anderer Weise schon gefunden habe (S. 118). Abb. 5 zeigt uns die Erscheinung, dass eine höhere Zuckerkonzentration die Stärkebildung wieder rückgängig macht.

Es wurde noch festgestellt, dass die untere Zuckerkonzentration, wobei sich im Palissadengewebe bei 28°C. noch eben einige Stärke bildet (bei 28°C.) ungefähr bei 1/40 % Saccharose und Glukose liegt (nur in einigen Chloroplasten in den lebenden Zellen bei der Schnitte). Dieser Wert der Stärkebildungsschwelle stimmt im Groszen und Ganzen überein mit der Konzen-

tration, wobei sich durch Assimilation eben Stärke bildet (ungef. 0.03 % Zucker). Die von RYWOSCH beobachteten Vorgänge in Hyacinthus- und Pinusblättern entbehren einen logischen Grund. Die Versuche habe ich für Hyacinthus wiederholt und fallen auch genau so aus, wie bei den anderen von mir verwendeten Versuchspflanzen und nicht wie RYWOSCH angibt. In „JOST“ (4) wird auf diesen Versuchen m. E. einen viel zu grossen Wert gelegt.

Um die Stärkebildung aus Zuckerlösungen quantitativ zu ermitteln, wurden die Blätter durch Öffnungen in einer Blechplatte gesteckt, und nach 2 Tagen war durch Verdunstung Zucker im Blatt eingedrungen. Die Blätter bei 24 % Glukose und 40 % Saccharose waren dann deutlich plasmolysiert. Nach 2 Tagen wurden die Blätter aus der Lösung genommen und der Blattteil, der darin gesteckt hatte, sowie der Hauptnerv entfernt. Die Ergebnisse der Kohlenhydratenbestimmungen findet man auf S. 31. Aus der Trockengewichtsvermehrung sieht man, dass grosse Quantitäten Zucker hineingedrungen sind. Es zeigt sich dabei, dass:

a. davon nur sehr wenig in der ursprünglich hineingedrungenen Form zurückzufinden ist; sofort nach dem Eintreten in der Zelle wird also die Glukose in geringerem Masse auch die Saccharose und Maltose, in andere Verbindungen übergeführt;

b. einen grossen Teil findet man bei den hypotonischen Konzentrationen als Stärke zurück. Ein grosser Teil aber ist nicht als Kohlenhydraten anwesend. Bei 8 % Glukose ebenso wie nach 11 stündiger Bestrahlung mit 24000 M.K. bei 28° C. nur ungefähr 50 %. Aus dem Zucker sind also auch sofort andere Verbindungen entstanden, was auch aus dem Niederschlag mit bas. Bleiacetat hervorging: dieser war viel grösser, wenn die Blätter in höheren Konzentrationen gestanden hatten. Die Verbindungen, welche ausserdem direkt aus Zucker gebildet werden, sind vielleicht Gerbstoffe¹⁾ (vgl. BÜSGEN), Nikotine (vgl. ADOLF MAYER) und möglich auch organ. Säure, welchen gebunden an K oder Na vielleicht die Bedeutung von Transportstoffen zufällt.

Ich komme in diesem Zusammenhang noch zu sprechen über die Frage des ersten Assimilationsproduktes. PARKIN, WENT, BROWN AND MORRIS, DAVIS c.s. meinen, dass Saccharose das zuerst gebildete Kohlenhydrat ist, weil sie in vielen Blättern in ziemlich grossen Quantitäten zu finden ist, während Glukose nicht oder nur wenig anwesend ist. Wenn man Glukose aber aus Lösungen eindringen lässt, findet man auch keine Glukose zurück, weil sie unter diesen Verhältnissen nicht bestehen kann. Das Fehlen einer Zuckerart sagt also gar nichts aus darüber, ob sie wohl oder nicht in dieser Form entstanden ist. Die Bayersche Formaldehydhypothese wird auch nicht als unmöglich betrachtet, weil kein Formaldehyd im Blatt vorzufinden ist. Genau so liegt die Sache hier. Und weil es theoretisch wahrscheinlich ist, dass zuerst eine Monose

1) Ich habe bewiesen, dass aus Zuckerlösungen im Dunkeln Gerbstoffe entstehen:

	Trockengewicht	Gerbstoffe in 10 Gr. frischen Blättern
Im Wasser 3 Tage bei 28° C. im Dunkeln	3,2 %	21 mGr.
In 7½ % Glukose wie oben.....	9,3 %	164 mGr.
In 24 % Glukose wie oben.....	16,1 %	239 mGr.

entsteht, kann ich die Saccharose nicht als erstes Assimilationsprodukt ansehen. Ausserdem ist die chemische Zusammenstellung der Blätter, welche assimiliert haben und welche in Glukose standen sehr ähnlich, sodass nichts dagegen spricht, dass auch bei der Assimilation als Zwischenprodukt Glukose auftritt;

c. in den plasmolysierten Blättern finden wir auffallend mehr Zucker zurück als in den nicht plasmolysierten Blättern, hauptsächlich als Saccharose und ein wenig gespalten als Monose. Der Einfluss der Plasmolyse, dass das Kohlenhydratengleichgewicht sich verschiebt in Abbau von Stärke und gleichzeitig in Bildung von Saccharose geht deutlich hervor, wenn wir die Ergebnisse 14 % Glukose vergleichen mit 14% Glukose + 4 % NaCl (die gleiche Menge Zucker, aber eine hypertonische Lösung!).

7. DIE BEDEUTUNG DER KOHLENHYDRATE BEIM STOFFTRANSPORT IM BLATT.

Wir sahen, dass bei einer Zuckerkonzentration von $\frac{1}{4}\%$, also bei ungefähr dem 10-fachen der im jungen Tabaksblatt vorzufinden den Konzentration noch keine bedeutende Fortleitung von Zucker stattfindet. Theoretisch stellen sich bei der Vorstellung des Zuckertransportes hauptsächlich zwei Schwierigkeiten im Wege. Erstens die geringe Diffusionsschnelligkeit des Zuckers und zweitens die schlechte Durchlässigkeit vieler Plasmamembranen für Zuckerarten. Auf ersteres hat schon DE VRIES hingewiesen und er meinte, dass durch Plasmaströmung die Diffusion des Zuckers beschleunigt wird. BIERBERG schliesst diese Erklärung für die schnellere Wanderung des Zuckers aber aus, weil Plasmaströmung gar keine allgemeine Eigenschaft der Zellen ist. RYWOSCH hat aber noch andere Überlegungen angeführt, um uns den Zuckertransport etwas begreiflicher zu machen. Erstens hat er gefunden, dass 2 % Glukose und 2 % Saccharose 8 % schneller wandern als jede für sich. Natürlich kommt diese Beschleunigung bei der ausserordentlich kleinen Diffusionsschnelligkeit nicht in Betracht. Er meinte aber zweitens, dass die Stärkescheide durch die Stärke zu fixieren, das Diffusionsgefälle erhöht. Wenn aber die Kohlenhydrate sich in dieser Weise dort ansammeln würden, so konnte man dies für den Stofftransport doch nicht als erwünscht ansehen. Drittens meinte er, dass die Transpiration die Diffusionsschnelligkeit beschleunigt. Er beobachtete nämlich, dass Austrocknen das Verschwinden der Stärke verschnellte. Aber wie ich noch beweisen werde, hat dieser schnellere Stärkeabbau nichts mit Abführung zu schaffen, was u.A. schon daraus hervorgeht, dass bei abgeschnittenen Blättern, welche trocken liegen und also nichts ableiten können sogar noch deutlicher dieser verschnellte Stärkeabbau zu Tage tritt.

Noch schwieriger ist es, sich eine Vorstellung zu machen der Diffusion des Zuckers durch die Plasmamembranen. Plasmolyse ist mit Zuckerlösungen sehr leicht zu bewirken, und diese hält sich auch sehr lange. Ich glaube, dass man dem Zucker als Transportstoff einer viel zu grosse Bedeutung zuerkannt hat, und dass wir andere Stoffe suchen müssen, die diese Funktion in der Pflanze erfüllen.

Auch in den anderen von mir untersuchten Pflanzen tritt bei Kon-

zentrationen von 1—4 % Zucker nur Stärke bei der Schnittfläche auf und sind bei Assimilation Fotografien (nach der Jodprobe) zu erhalten, was alles auf eine geringe Wanderung des Zuckers von Zelle zu Zelle deutet.

RUHLAND versuchte die Frage des Zuckertransportes für *Beta vulgaris* teilweise zu lösen. Zwei Sachen müssen dabei in erster Linie klargelegt werden:

- a. Wie ist die Permeabilität der verschiedenen Zellen für die Zuckerarten;
- b. Wie ist das Konzentrationsgefälle in den Geweben für diese Zuckerarten.

Er fand, dass die Permeabilität der Zellen, auch die der Siebgefässe, äusserst gering ist. Die Zellen der Knollen sind wenn möglich noch undurchlässiger für die Zuckerarten. Auch muss man davon absehen, sagt RUHLAND, dass die Saccharose als solche nach dem Knollen wandert, denn die Saccharose nimmt in der Richtung dieses Organs zu. Es scheint mir daraus dass wir eher annehmen müssen, dass der Zucker in der Zelle so festgelegt ist, wie die Stärke, und dass von einer bedeutenden Wanderung nicht die Rede sein kann. Man kann sich vorläufig vorstellen, dass andere Verbindungen wandern, woraus in den Zellen teilweise Zucker gebildet wird. Wenn in den Zellen des Rübenknollens daraus ungefähr eine völlige Umwandlung in Zucker stattfindet, bleibt das Konzentrationsgefälle der Transportstoffe behalten, während die Undurchlässigkeit der Plasmamembrane für Zucker das Zurückströmen unmöglich macht. So kann z.B. auch im Zuckerrohr sich der Zucker anhäufen, ebenso wie die Stärke im Kartoffelknollen.

8. VERSUCHE ÜBER DIE BILDUNG VON STÄRKE AUS ZUCKERLÖSUNGEN BEI $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C.

Nach 4 wöchentlichem Aufenthalt bei $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C. ist in keiner der Zuckerlösungen im Tabaksblatt die geringste Stärkebildung zu beobachten. Aus Tabelle 3 ist ersichtlich:

- a. dass ebenso wenig wie Stärke auch keine Maltose gebildet ist;
- b. dass der Zucker wohl in das Blatt hineingedrungen ist (Trockengewichtsvermehrung);
- c. dass von Glukose etwas mehr und von Saccharose viel mehr zurückzufinden ist, als bei 28° C. Diese Zuckerarten scheinen bei $1\frac{1}{2}^{\circ}$ C. in den Zellverhältnissen also etwas stabiler zu sein. Ein grosser Teil des Zuckers muss aber auch hier in andere Verbindungen umgewandelt sein, was ebenfalls wieder aus dem Niederschlag des Blattextraktes mit bas. Bleiacetat hervorging.

Beim Tabaksblatt ist die Stärkebildung aus Zucker also sogar bei den günstigsten Konzentrationen gehemmt. Bei *Tropaeolum* liegt die Sache etwas anders. Obwohl auch hier die Stärkebildung im Vergleich mit 28° C. stark zurückgegangen ist, kann man von 1 bis 14 % Glukose und 1 bis 24 % Saccharose noch etwas Stärke im Mesophyll antreffen. In der Leitscheide (Nervenparenchym) trifft man wieder die Stärke sowohl bei höheren als bei niedrigeren Konzentrationen an als im Mesophyll.

Es zeigt sich hier mit überraschender Deutlichkeit, dass das System Stärke-Zucker sich in der Richtung von Stärkeabbau verschiebt unter Einfluss der niedrigen Temperatur. Das ist genau dasselbe, was MÜLLER—

THURGAU (57, 58) durch seine schönen Versuche für die Kartoffel (das süß werden) klargelegt hat. Und auch CZAPEK (15) sah, dass der Stärkegehalt der Schliesszellen vieler Pflanzen bei 1°C . zurückgeht und bei Rückkehr nach 17°C . (im Dunkeln) wieder vermehrt. Das Auftreten von Zucker in Bäumen im Winter beruht ohne Zweifel auf demselben Prinzip. Auch LIDFORSS (42) beschreibt, dass in wintergrünen Pflanzen bei Überbringen in 33°C . die Stärke schon nach $\frac{1}{2}$ Stunde (im Dunkeln) zurrückkehrt. Er meinte, dass die unterbliebene Stärkebildung bei diesen niederen Temperaturen dem Sauerstoffmangel zuzuschreiben sei. Dass O-Mangel die Stärkebildung nicht unmöglich macht, wurde mir deutlich durch Versuche unter der Luftpumpe. Aber wenn LIDFORSS selber mitteilt, dass bei Überbringen in höheren Temperaturen, das Öffnen der Schliesszellen 10 Tage und mehr dauert, während die Stärkebildung schon nach einer halben Stunde auftritt, kann der Sauerstoffmangel die Erscheinung auch nicht erklären. Ohne Zweifel ist die Erklärung für die von LIDFORSS gefundenen Tatsachen auch in der Verschiebung des Stärke-Zuckergleichgewichts in der Richtung von Stärkeabbau zu suchen.

9. DIE UMWANDLUNG DER STÄRKE BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN.

Jetzt wollen wir uns den Verhältnissen zuwenden, wobei die Hydrolyse der Stärke die Synthese übertrifft und Stärke also abgebaut wird. Dies geschieht im allgemeinen wenn die Blätter im Dunkeln stehen und keine Zufuhr durch Assimilation oder aus Zuckerlösungen die Abnahme durch Atmung (und Ableitung?) anfüllen.

Wie schon früher bemerkt wurde, sagen die Versuche von SACHS (76) wenig aus über den Einfluss der Temperatur auf die Stärkeumwandlung. HUNGER (34), der in Deli unter mehr gleichmässigen Temperaturverhältnissen der Tropen arbeitete mit Tabak meint, dass die Umwandlung (er sagt leider: Ableitung) bei höherer Temperatur beschleunigt wird.

Einige Vorversuche, wobei Tropaeolumpflanzen aus dem Freien in bestimmten Temperaturen übergebracht wurden, zeigten, obwohl hier die grosse Variabilität deutlich zu Tage trat, dass wahrscheinlich das Verschwinden der Stärke bei höherer Temperatur bedeutend schneller vor sich geht. Es wurden darauf Versuche angestellt mit in bestimmter Weise vorbehandelten Tabakspflanzen. Um 10 Uhr Morgens als die Blätter eben stärkeleer waren, fing eine Bestrahlung mit 24000 M.K. an. Wenn $4\frac{1}{2}$ Stunden bestrahlt war, wurde bei $1\frac{1}{2}^{\circ}$, 17° , 10° und 28°C . je ein Topf im Dunkeln gestellt, und die Stärkeumwandlung verfolgt. Genau dasselbe geschah nach 11 stündiger Belichtung. Das Resultat zeigt Tabelle 4. So sehen wir z.B., dass bei $1\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. die Blätter 8 bis 10 Mal soviel Zeit brauchen um die Stärke zu verlieren, als bei 28°C .; $Q_{10} = \text{ungefähr } 2$.

Wie soll man die Umwandlung der Stärke erklären? Neben einander finden Synthese und Abbau von Stärke statt. Wenn die Produkte des Abbaus in der Pflanzenzelle anwesend blieben, könnte man bald ein Gleichgewicht erwarten, wobei der Zucker- und Stärkegehalt sich nicht ändern würden. Letzteres ist nicht der Fall. Es wird also wahrscheinlich

Zucker der Lösung entzogen, wodurch sich von neuem Stärke spaltet ¹⁾. Wie soll man sich das Entziehen des Zuckers an die Zelle vorstellen? Man hat wohl ohne Ausnahme gemeint, dass der Zucker abgeleitet wird. Obwohl wir sahen, dass Zucker als solche nicht abgeführt wird, wäre es doch möglich, dass genau so wie bei der Assimilation der Zucker in Transportstoffe übergeführt wurde, was bei Ableitung dieser Verbindungen zu neuen Umwandlungen von Zucker und somit auch von Stärke Veranlassung geben würde. Um zu entscheiden ob dies wirklich geschieht, habe ich Tabaksblätter, welche Stärkereich waren mit der einen Hälfte an der Pflanze gelassen (28° C.), die andere Hälfte aber habe ich abgenommen und in feuchter Umgebung (aber nicht in Berührung mit Wasser, sodass von Ableitung nicht die Rede sein konnte) gestellt (28° C.). Wiederholt wurde nun gefunden, dass beide Blattteile die Stärke ungefähr ebenso schnell verloren. Wenn die Hälfte an der Pflanze dazu 18 Stunden brauchte war dazu bei der abgeschnittenen Hälfte 22½ Stunden nötig. Obwohl ein geringer Einfluss ersichtlich ist, beobachtet man doch, *dass ungefähr für 80 % die Stärke auf anderer Weise verschwinden muss als durch Ableitung.*

Es bleibt m. E. nur eine Möglichkeit zur Erklärung dieser Zuckerentziehung übrig, nämlich: *die Stärke verschwindet aus dem Blatt, hauptsächlich, weil sie (in ihren Abbauprodukten) veratmet wird.*

Ich habe noch versucht dies zu beweisen. Wenn man Blätter im luftleeren Raum feucht aufbewahrt, oder auch als ich die Blätter unten in ausgekochtes Wasser legte und ebenfalls wenn sie in Wasserstoff oder Kohlensäure aufbewahrt wurden, ging der Stärkegehalt sogar nach einer halben Woche bei 15°—22° C. nicht im geringsten zurück, während die an der Luft in Wasser stehenden Blätter die Stärke schon lange verloren hatten. Obwohl dies der Beweis scheint, habe ich ausserdem gezeigt das offenbar die diastatische Abbauenzyme nicht ohne Sauerstoff arbeiten, dass sie im Blatt die Stärke also nicht in Zucker spalten. Weil es unmöglich ist diese Enzyme mit Sauerstoff zu versehen, zugleich aber die Atmung durch Sauerstoffmangel zu hemmen, ist der direkte Beweis für die Veratmung der Stärke nicht zu liefern. Wohl gibt es noch einige Tatsachen, die ich indirekt zum Beweis heranziehen will.

DELEANO (22) studierte die Atmung abgeschnittener Laubblätter im Dunkeln. Er zeigt dabei, dass die Menge CO₂, welche durch Atmung entsteht so lange noch Kohlenhydrate anwesend waren, übereinstimmt

1) Man muss dann, wenn die Stärke verschwunden ist, weniger Zucker im Blatt finden, als wenn das Blatt Stärkereich ist. Ich sah wirklich den schon geringen Gehalt an Zucker beim Verschwinden der Stärke noch zurück gehen. (Vgl. die Tabelle 6). Genau dasselbe fanden DAVIS c.s. (18) sehr deutlich während der Nacht bei Kartoffel- und Beta-blättern. BROWN AND MORRIS (10) meinten, dass bei Tropaeolum die Stärke in der Form von Zucker grösstenteils zurückkehrt. Obwohl ihre Ergebnisse in dieser Hinsicht aus vielen Gründen zu bezweifeln sind, könnte man sich doch etwas Ähnliches vorstellen, wenn man annimmt dass im Dunkeln das System Stärke-Zucker verschoben wird, und die Abbauenzyme in Verhältnis zu den Aufbauenzymen zunehmen. Nun konnte BROWN zeigen, dass die diastatische Kraft des Blattpulvers grösser wird, wenn die Blätter im Dunkeln gestanden haben. Dies sagt noch wenig aus über die enzymatische Wirkungen *im* Blatt, wie ich noch zeigen werde. Aber es sagt gar nichts über das *Verhältnis* Abbauenzyme: Aufbauenzyme, worum es sich handelt. Ich meine, dass man sich darüber ein Urteil bilden kann aus der Grenze, wobei die Leukoplasten noch Stärke aus Zuckerlösungen bilden. Bei Tabak ändert sich diese Grenzkonzentration bei mehrtägigem Aufenthalt im Dunkeln nicht merklich. Für Tabak gilt also jedenfalls die Vorstellung, welche wir uns bei unveränderter Wirksamkeit der Abbau- und Aufbauenzyme bilden müssen, und welche ich hier als Leitfaden bei der Beweisführung gefolgt habe.

mit dem Verschwinden der Stärke- und Zuckermengen. Erst später werden auch die anderen organischen Verbindungen veratmet. Ist die Atmung im Stande die Stärkeverminderung für 80 % zu erklären? Es bestehen wenig Angaben über das Verhältnis zwischen Atmung und Assimilation. BLACKMAN AND MATTHAEI (8) geben für *Helianthus* bei 29° C. an: Atmung pro 50 cm². Blattoberfläche: 0.0020 Gr. CO₂; Assimilation: 0.0097 Gr. CO₂; Verhältnis also 1 : 4.9. Wir fanden bei Tabak, dass dasjenige was bei 28° C. in 11 Stunden an Stärke gebildet wurde in 11 + 28 St. = 39 St. verschwand (Verhältnis $\frac{\text{Atmung}}{\text{Stärkebildung}}$ 1 : 4.3); in 4½ St. wurde soviel Stärke gebildet, dass sie in 4½ + 15 St. = 19½ St. verschwand. Hierbei ist angenommen worden dass Assimilation = Stärkebildung und alle Stärke verschwinden = Atmung, was nicht der Fall ist.

Weil im Tabaksblatt bei 28° C. ungefähr die Hälfte der assimilierten CO₂ als Stärke zurückzufinden ist, ist das Verhältnis $\frac{\text{Atmung}}{\text{Assimilation}}$ nicht grösser als 1/7 bis 1/10, also sicher nicht zu gross um anzunehmen, dass beinahe alles veratmet werden kann. Meines Erachtens können wir dann auch sagen, dass die Stärke, welche bei der Assimilation im Tabaksblatt gebildet ist, zum grössten Teil nicht mehr im Stofftransport bezogen wird; sie bildet das Energiematerial für die Atmung der Pflanzenzelle.

Dies führt uns zum Schluss, dass ebensowenig wie die Verteilung der Stärke, (wie SCHIMPER meinte) etwas über die Wanderwege der Kohlenhydrate aussagt, ebenso wenig ist auch die Schnelligkeit des Verschwindens der Stärke ein Mass für die Schnelligkeit des Transports. Eher gibt es für uns eine Andeutung über die Atmungsintensität (z.B. bei verschiedenen Temperaturen) ¹⁾. Wir haben also leider an der Jodprobe gar nichts für das Studium des Stofftransports.

Es wurde weiter bestimmt, wie sich der Zucker aus Blättern, die bei 28° C. 11 Stunden in 24000 M.K. Stärke gebildet hatten, beim Überbringen in verschiedenen Temperaturen verhielt. Für 1.5°, 5° und 10° C. findet man die Ergebnisse in Tab. 5.

Es gehen daraus einige Tatsachen mit Deutlichkeit hervor:

- die getrockneten Blätter zeigen einen viel höheren Gehalt an Zucker, als die in anderer Weise behandelten Blätter; der aus Stärke entstandene Zucker ist vorwiegend Saccharose;
- die Monosen kommen in einer einigermaßen bedeutenden Menge nur vor bei 1.5° C.;
- in den feucht gehaltenen Blättern, worin Zerlegungsprozesse auftreten, findet sich auch ziemlich viel Saccharose vor.

Es zeigt sich deutlich, dass bei den niedrigen Temperaturen die Atmung nicht so energisch ist, dass alle aus Stärke entstandene Zucker veratmet wird, und diese also hier auch nicht die Ursache der Atmung sein kann. Wir haben als Grund dafür hier die Verschiebung des Systems Stärke-Zucker anzunehmen. Es ist genau dasselbe was MÜLLER—THURGAU (57) bei der

1) Völlig Parallel gehen auch diese beide Erscheinungen nicht, weil niedrige Temperaturen Einfluss ausüben auf das Stärke \rightleftharpoons Zuckergleichgewicht der Tabaksblätter. Bei 1.5° C. ist die Stärkebildung, wie wir sahen ganz und gar unmöglich geworden, der Abbau schreitet noch fort; schon bei 10° C. gewinnt der Abbau an Bedeutung der Synthese gegenüber. Sodass bei Ueberbringen in diesen niedrigen Temperaturen Stärkeabbau statt finden kann, auch bevor der Zucker erst veratmet worden ist.

Kartoffel fand, und was ich auch bei der Bildung der Stärke aus Zuckerlösungen gefunden habe. Dort sahen wir, dass bei 1.5° C. das Mesophyll von Tabaksblatt die Eigenschaft verloren hat Stärke aus Zucker zu synthetisieren.

Es zeigt sich weiter, dass ein geringes Austrocknen schon sofort zu vermehrter Zuckerbildung Anlass gibt (Vgl.: am Anfang 7.2 % Trockengewicht und 4‰ Zucker; nach 4 Tagen bei 1.5° C. trocknen: 10.6 % Trockengewicht und 23‰ Zucker). Auch bei älteren Pflanzen (sowohl bei Blättern welche an der Pflanze, als welche abgeschnitten bewahrt werden) tritt diese Saccharosebildung deutlich zum Vorschein.

Was bei 28° C. und 40° C. aus der Stärke in die Form von Zucker zurückkehrt, ersieht man aus Tab. 6. Nur bei 8 Stunden, trocken ist noch etwas mehr Saccharose vorzufinden als in den übrigen Blättern. Trotz des beschleunigten Stärkeabbaues (trocken!) ist hier die Atmung offenbar so bedeutend dass alle Zucker sofort veratmet wird.

10. DER BESCHLEUNIGTE STÄRKEABBAU BEIM TROCKNEN UND EINIGE ANDEREN ERSCHEINUNGEN WELCHE DAMIT IN ZUSAMMENHANG STEHEN.

In Fig. 7 sieht man Blätter, welche (vor dem Versuche Stärkereich) bei 28° C. verweilt hatten, die rechten Hälften in trockner, die linken Teile in mit Wasser gesättigter Luft. Eine Wiederholung dieses Versuches geschah mit Blättern einer grossen blühenden Tabakspflanze. (Fig. 8). Wie wir im vorigen Abschnitt lernten, *kehrt die durch Trocknen beschleunigt abgebaute Stärke, wenn nicht direkt alles veratmet wird, zurück als Saccharose.*

RYWOSCH (70, 71) hat die Erscheinung des beschleunigten Stärkeabbaues durch Trocknen der beschleunigten Transpiration zugeschrieben: „So müsste ein energischer Wasserstrom eine bessere Ableitung der Stoffe aus den grünen Zellen, als ein schwacher Strom nach sich ziehen.“ Weil Stärkeabbau und Ableitung, wie wir zeigten in keinem deutlichen Zusammenhang stehen schien jene Erklärung schon unwahrscheinlich. Um dies weiter zu untersuchen wurde ein Blatt einer blühenden Pflanze durch einen Erlenmeyer mit CaO (trockene Luft) gesteckt, aber es wurde dafür gesorgt, dass der Wasserzufuhr von der Seite des Hauptstengels ungestört vor sich gehen konnte. Den folgenden Tag war das Blatt, das energisch transpiriert hatte, wasserreicher als andere Blätter an der Pflanze. Die Stärkeumwandlung war aber nicht weiter fortgeschritten als in den übrigen Blättern. Die Blätter, welche abgeschnitten trocken verweilt hatten, hatten ihre Stärke aber sehr bald verloren. Es geht hieraus hervor: *die beschleunigte Stärkeumwandlung findet nicht seinen Grund in vermehrter Transpiration, sondern in dem Austrocknen selbst.*

LUNDEGÅRDH (46) teilt eine diesbezügliche Beobachtung mit, dass bei Austrocknen bestimmter Moosarten „die Stärke schwindet, obwohl der Zellsaft konzentrierter wird“. ILJIN (37, 38) teilt Versuche mit, wobei Schliesszellen von Ranunculus und Rumex die Stärke bei Eintrocknen schnell verlieren. Auch MOLISCH (54) fand dasselbe bei mehreren Blattarten. SCHROEDER (82), HORN (33) und AHRNS (1) haben die Sache näher

studiert bei verschiedenen Blättern, u. m. für *Tropaeolum*. Ihre Ergebnisse führen ohne Zweifel zu ihrem Schluss: „es muss also der Rohrzuckergehalt als eine Funktion des Wassergehaltes angesehen werden, der gross ist bei geringem und klein bei hohem Wassergehalt“. Leider wird von diesen Forschern kein Wort über die Temperatur gesagt. War diese ungefähr die Zimmertemperatur, was wahrscheinlich ist, so sind ihre Ergebnisse völlig mit den unserigen im Einklang.

Es wird uns jetzt auch deutlich, dass *der Stärkeabbau und die Rohrzuckerzunahme in hypertonischen Zuckerlösungen, nichts anders ist, als das Entziehen von Wasser an den Zellen* (vgl. S.).

Ich habe näher versucht die Ursache dieser allgemein verbreiteten Erscheinung zu finden. Figur 9 zeigt das Resultat meiner diesbezüglichen Versuche. Es wurden Blätter, welche ihre Stärke im Dunkeln verloren hatten (28° C.) halbiert. Ein Teil der Hälften wurde noch einen Tag in feuchter Umgebung aufbewahrt. Der andere Teil wurde 8 Stunden trocken aufbewahrt, dann aber auf Wasser gelegt, wodurch nach weiteren 16 Stunden die Blätter wieder ihren normalen Wassergehalt zurück erhalten hatten. Beide verschiedenartig behandelte Blattteile wurden dann gelegt auf 8 % Glukose (28° C.). Nach eintägigem Verweilen strotzten die feucht gehaltenen Hälften von Stärke, die trocken gehaltenen Teile hatten keine oder sehr wenig Stärke gebildet. Die am trockensten gehaltenen Exemplare enthielten die geringste Menge; auch zeigte sich, dass das Stärkebildungsvermögen am längsten dem Mittelnerv entlang (wo am schwierigsten Wasser verloren wird) behalten bleibt. Es zeigt sich hieraus: *beim Eintrocknen der Blätter tritt sehr bald Absterben der Stärkesynthese-enzyme auf, die hydrolysierenden Enzyme sind resistenter*.

Wir verstehen jetzt auch warum, wie AHRNS (1) und ILJIN (37, 38) fanden, der Prozess *nicht direkt reversibel* ist. Ich bemerke noch, dass an der Pflanze die Blätter im Lichte die Enzyme der Stärkesynthese zurückbilden.

WATERMAN (94, 95, 96) fand Stärkeabbau und Saccharosebildung beim Trocknen der Kartoffel bei 35°—55° C. Dies ist genau dieselbe Erscheinung, nämlich dass die Abbauenzyme länger arbeiten, als die Syntheseenzyme der Stärke, wenn wir bestimmte Lebensgrenzen der Pflanzen überschreiten. Auch bei niedrigen Temperaturen sahen wir die Wirksamkeit der synthetisierenden Enzyme sich früher einstellen als die der spaltenden Enzyme. Wenn man den Grenzen des Pflanzenlebens näher kommt, zeigt sich die Stärkesynthese, als endotemer Prozess am sensibelsten, die Funktion der Hydrolyse stirbt erst später ab. *In diesem Übergangsgebiet zwischen Leben und Tod ist das Kohlenhydratgleichgewicht in der Richtung von Stärkeabbau und Saccharosebildung verschoben*.

Es kommt mir vor, dass das „Reifen“ des Zuckerrohrs, wie z. B. WENT (99) es studiert hat, für diese Pflanze gar nichts anders ist als ein solches Übergangsgebiet. Auch das Reifen der Früchte ist etwas Ähnliches und PRINSEN GEERLIGS (65) hat gezeigt, wie in abgepflückten Früchten von *Musa* und *Mangifera* in kurzer Zeit die ganze Stärkemenge in Saccharose umgewandelt wird.

LUNDEGÅRDH (46) sah beim Eintrocknen von Ölsamen (*Cucumis*, *Cucurbita*, u.s.w.) alle Stärke über Zucker in Öl umgewandelt werden; das umgekehrte geschah beim Aufquellen dieser Samen.

Weiter sah er, dass in Samen, welche keine Stärke enthalten „das System

Stärke-Zucker gegen Wasser empfindlich ist, in dem Sinne, dass Trockenheit das Auflösen der Stärke begünstigt". Die sogenannte „Solarisation" URSPRUNG's (88) ist auch der Austrocknung bei langdauernder Belichtung zuzuschreiben und Frl. HORN (33) hat gezeigt wie die Ergebnisse GIRARDS (29) und auch diejenigen von BROWN und MORRIS (10) aus dem Einfluss von geringem Austrocknen auf das System Stärke-Saccharose zu erklären sind. Ohne Zweifel haben wir hier mit einer Erscheinung grosser Verbreitung und Bedeutung zu schaffen.

Wie wir in Fig. 2 sehen ist in abgeschnittenen assimilierenden Blättern, wo Eintrocknen in keiner Weise zu umgehen ist, die Stärkebildung noch am intensivsten dort, wo das Blatt im Wasser gestanden hat. Aber auch in einem normalen Blatt ist das Austrocknen, woran das Blatt doch immer durch Wind, direkte Besonnung, u. s. w., ausgesetzt ist, nicht an allen Stellen dasselbe. Es sind ja die grösseren Nerven, wo der Wassergehalt wenig zurück geht und auch das Mesophyll in derer Umgebung, wo der Wassergehalt am schnellsten wieder angefüllt wird. Wir begreifen nun, warum den Nerven entlang sich die Stärke am längsten hält und warum in den Leukoplasten des Nervenparenchyms das Stärke-Zuckergleichgewicht in der Richtung von Synthese bevorzugt ist.

Stärke erfüllt wie wir sahen die Rolle des Energiematerials für die Atmung; *Saccharose* ist das typische Abbauprodukt der Stärke; die *Monosen* sind die ersten Assimilationsprodukte, die Bausteine der organischen Pflanzenstoffe, welche sofort zu ihren Aufbau verwendet werden. *Maltose* bildet vielleicht die Zwischenstufe in dem Aufbau der Stärke. Man soll beachten, dass Schlüsse über die enzymatischen Vorgänge in der Pflanze aus der diastatischen Wirkung von Blattpulver mit grossem Vorbehalt aufgestellt werden müssen. Denn Blattpulver liefert Maltose als Abbauprodukt der Stärke und wirkt auch bei Sauerstoffmangel; das spaltende Enzym in der lebenden Zelle bildet aber aus Stärke Saccharose und *nur* bei O-Anwesenheit.

11. DIE GERINGE STÄRKEUMWANDLUNG IM MOSAIKKRANKEN TABAKSBLATT UND IN ANDEREN VIRUSKRANKEN PFLANZEN.

HUNGER (35, 36) und WOODS (102) sahen, dass im Dunkeln aus den kranken Teilen die Stärke nicht schwindet. QUANJER (66, 67) und seine Mitarbeiter fanden bei ihren eingehenden Untersuchungen über die Blattrollkrankheit der Kartoffelpflanze auch die Stärkeschoppung als typische Erscheinung auftreten. Und QUANJER machte ebenfalls darauf aufmerksam dass auch für Viruskrankheiten anderer Pflanzen diese Stärkeschoppung angegeben wird. (Sandelbaum: COLEMAN (13); NEGER (61): Syringa und Flieder; SMITH (83): Pfirsich; SUSUKI: Maulbeerbaum (84), LAMKEY: Nelke). Bis jetzt hat man aber gemeint, dass diese Schoppung bei der Kartoffel in der Necrose des Phloeems begründet war, wodurch die Ableitung gehemmt wird. Es ist, wie wir jetzt wissen die Umwandlung keine Funktion der Ableitung, also kann die Schoppung auch nicht einer Ableitungsstörung zugeschrieben werden.

Es bleiben m. E. zwei Möglichkeiten zur Erklärung übrig: a. das Virus

hat Einfluss auf das Stärke-Zuckergleichgewicht, das unter Einfluss dessen in der Syntheserichtung verschoben wird; *b.* das Virus hemmt die Atmung und infolge dessen auch den Stärkeabbau.

Das Eintrocknen von abgeschnittenen Blatthälften mosaikkranker Tabaksblätter und blatrollkranker Kartoffelblätter zeigte, dass auch dann die Stärke bald verschwindet! Auch hierdurch wird bewiesen, dass die Schoppung mit Ableitungsstörungen nichts zu schaffen hat. Die Analyse der Blätter bei 28° C. zeigte, dass alle Zucker veratmet worden war, ebenso bei gesunden Blättern. Wie BEYERINCK (5) gefunden hat bleibt das Virus in trocknen Blättern anwesend. Die Atmung hat also auch bei der Virusanwesenheit normal stattgefunden: das Virus übt keinen schädlichen Einfluss auf die Atmung aus. Wir müssen also jetzt annehmen, dass das Virus die Aufbauenzyme den Abbauenzymen gegenüber gefördert hat. Weil beim Trocknen diese Enzyme absterben kann das Virus seine Arbeit auch nicht mehr ausüben und wird die Stärke abgebaut. Die assimilierende kranke Pflanze bildet also aus den Monosen mehr Stärke als gesunde Pflanzen; Transportstoffe werden weniger gebildet, fast alles wird als Stärke festgelegt, die Assimilation wird ausserdem bei Stärkeanhäufung schliesslich auch geringer (Frl. HENRICI (31)); dies sind die Ursachen des geringeren Wachstums und der geringeren Entwicklung. Diese Erklärung ist nun auch für alle anderen Viruskrankheiten möglich, was nicht für die Necrose gesagt werden kann, weil diese hierbei nicht überall auftritt. Auch die stellenweise Schoppung in mosaikkranken Tabaksblättern kann nicht von der Phloemnecrose, wohl vom Viruseinfluss auf die Stärkesynthese erklärt werden.

HILTNER (32), ESMARCH (24), sowie NEGER (61) meinen, dass man als die Ursache der Stärkeschoppung die Ableitungsstörungen ansehen muss. Da NEGER beobachtet und sagt: „Am vollkommensten ist die Stärkeumwandlung bei Blättern, welche trockner Luft ausgesetzt schnell welken“, (diese Blätter waren abgeschnitten) ist es unbegreiflich, wie er die Schoppung einer Hemmung in der Ableitung zuschreiben kann. Auch MURPHEY sagt: „An even more rapid disappearance of starch is to be observed (as NEGER also noted) in the case of cut leaves and shoots which are not put standing in water, and which wilt in consequence. The obvious conclusion, however, that translocation could not account for the disappearance in this case was not drawn by this worker“. NEGER meint jedoch, dass diese Tatsache deutet auf Abhängigkeit der Stärkeableitung vom Luftzutritt, und dass dadurch der welkenden Pflanzen mehr Sauerstoff zur Verfügung steht. Er beweist aber ausserdem, dass durch das Trocknen die Schliesszellen geschlossen werden, was doch nicht zu vermehrtem Sauerstoffzutritt führen kann.

Obwohl man aus der diastatischen Wirkung nicht mit Gewissheit auf das Geschehen in der Pflanzenzelle schliessen kann, ist es doch wohl merkwürdig, dass wie NEGER bemerkt „es sich hier um eine schwere Störung der enzymatischen Vorgänge in der Pflanze handelt“. Krankes Blatt zeigt nämlich eine grössere Wirkung mit Guajacharz und Wasserstoffperoxyd. NEGER glaubt, dass dies eine Reaktion auf Diastase bildet, was unrichtig ist; wohl ist es eine Reaktion auf andere Enzyme. (Peroxydasen).

12. DIE UMWANDLUNGEN BEIM TROCKNUNGS- UND FERMENTATIONSPROZESS, BESONDERS WAS DEM KOHLENHYDRATGEHALT ANBELANGT.

Man weiss ausserordentlich wenig von dem Zusammenhang, welcher zwischen Qualität des Blattes und chemischer Zusammenstellung besteht. Wohl meint man, dass ein hoher Gehalt an Eiweiss, Chlor und SO_2 ungünstig und ein hoher Gehalt an Amidostickstoff, (gebunden) organ. Säuren, K und CO_2 , vorteilhaft für die Qualität sind. Was Stärke und Zucker anbetreffen, meint FESCA (25) „dass Stärke und Zucker die Qualität des fermentierten Rauchguts verringern“, und GARNER (26) sagt: „if there is no means of removing this starch the tobacco is harsh, lifeless and „strawy““. In Nied. Indien hat man eingehend untersucht welche die beste Zeit für das Pflücken ist, wobei man (HUNGER (34), MOHR (53)) zum Schluss gelang, dass man früh am Morgen pflücken muss, weil dann keine oder wenig Stärke im Blatt anwesend ist. Diese Forscher sahen also die Stärke sogar bei der Ernte schon als ungünstig an. Es ist wohl interessant, dass MÜLLER—THURGAU (56), der Tabakmuster aus allen Teilen der Welt untersuchte zum Schluss gelang: „Es scheint, dass die besseren Sorten eher Stärke enthalten“, obwohl er doch im allgemeinen den Gehalt als ziemlich gleichgültig ansieht.

Ausserdem meint MÜLLER—THURGAU, dass die Tabaksblätter „reif“ sind, wenn sie strotzen von Stärke und die typische gelbe Verfärbung würde sogar durch das Platzen der Chlorophyllkörner infolge der Stärkeanhäufung auftreten. Stärke-Ueberfülltheit und Reifheit sind also analog nach MÜLLER. In Nied. Indien betrachtet man die Blätter morgens als reif, wenn keine Stärke im Blatt zu sehen ist! Wenn man auf Grund praktischer Erfahrung dazu kommt, darf man doch wohl schliessen, dass der Stärkegehalt bei der Ernte keine grosse Bedeutung für die Qualität des Rauchguts hat. Dieses Ergebniss stimmt mit dem, was wir jetzt über die Stärkeumwandlungen wissen gut überein. Was wird nämlich der Unterschied sein zwischen getrocknetem und fermentiertem Tabak, welcher bei der Ernte stärkefrei war (Indien: Morgenschnitt) und diesbezüglichen Blättern, welche stärkereich waren (Indien: Nachmittagschnitt). Erstere Blätter hatten während der Nacht ihre Stärke und ihren Zucker durch Atmung verloren. Stärkereich geerntete Blätter werden bei einer Trocknung, wie diese in Indien und Europa üblich ist (nicht zu schnell) einer beschleunigten Stärkeumwandlung unterliegen, wodurch Zucker entsteht, der im Laufe des Trocknungs- und Fermentationsprozesses weiter veratmet wird. Beide Rauchgutsorten werden also, was ihren Kohlenhydratgehalt anbetrifft nicht verschieden sein, weil sie beide keine Kohlenhydrate mehr enthalten werden. In Indien ist man mit Sicherheit zu dem Resultat gelangt, dass der Morgenschnitt ein bessere Qualität liefert: nämlich eine bessere Farbe, grössere Brennbarkeit und geringere Dicke hat.

Es sind nun wahrscheinlich andere Produkte, welche direkt bei der Assimilation entstehen, und welche also auch einer täglichen Periodizität unterliegen wie Stärke, die hierfür verantwortlich sind. Schon LOEW (43) hat die „Reifheit“ in dem Verhalten anderer Verbindungen gesucht, nämlich in den organischen Säuren.

Während der Trocknung verschwindet die Stärke bald; diese Umwand-

lung wird von der langsamen Austrocknung begünstigt. Bei trocknendem „Ameronger“ Tabak befand sich nach 10 Tagen gar keine Stärke mehr im Tabaksblatt und auch war praktisch der Zucker daraus verschwunden durch Atmung. Unsere Erwartung stimmt mit diesem Resultat also überein.

Nur kann man an den geknickten Stellen und wo das Blatt beschädigt wurde bisweilen Stärke auch nach der Trocknung und Fermentation beobachten, wie das auch MÜLLER—THURGAU beschrieben hat. Er sagt: „dabei gelingt man unwillkürlich zu der Anschauung, alsob dieselben vielleicht bei oder bald nach der Ernte mehreremal nach verschiedenen Richtungen zusammengeknittert worden wären“. Ohne Zweifel hat MÜLLER hier Recht, denn wir wissen, dass in gequetschten Zellen, die Stärke in keinerlei Weise in Zucker zu verwandeln ist. Aber wie ist es denn möglich, dass doch in bestimmten Tabaksmustern sich noch Stärke auch mehr regelmässig verteilt befand. Auch dafür hat MÜLLER die plausible Lösung gegeben, wenn er bemerkt: dann hatten diese Muster „durchaus das Aussehen von sehr rasch getrockneten Blättern, was sich namentlich in der gelblich grünen Farbe zu erkennen giebt.“ Beim schnellen Eintrocknen sterben auch die hydrolysierenden Enzyme so bald, dass der Abbau nicht völlig stattfinden kann.

MÜLLER—THURGAU hat sich von der Stärkeumwandlung in abgeschnittenen Blättern welche zu trocknen hangen eine unrichtige Vorstellung gemacht. Die Ableitung, der man diese Umwandlung zuschreibt, konnte jetzt nicht als Erklärung gelten. Darum meinte er: „Ist dagegen das Blatt abgebrochen, so steht der sämtliche entstehende Zucker den athmenden Zellen zur Verfügung, was die Athmungsintensität erheblich steigert. Ja es ist nicht unwahrscheinlich, dass gerade in Folge der verstärkte Athmungsvorgänge andererseits auch die Umwandlung der Stärke in Zucker beschleunigt und hierdurch wieder die Athmung noch mehr gesteigert werden kann“. Dass dies keine Erklärung sein kann, ist doch wohl ohne Weiteres verständlich, denn diese Beweisführung dreht sich in einen viziösen Kreis herum!

BEHRENS (3) sucht die Lösung, weil Wanderung der Kohlenhydrate hier ausgeschlossen ist, „in der Herstellung der Bruch- resp. Schnittfläche an der Basis des Blattes resp. der des Stammes“. Dass aber auch diese Erklärung nicht haltbar ist, geht aus folgenden Überlegungen hervor:

a. Eben den Schnittflächen entlang schwindet die Stärke niemals (getötete Zone);

b. abgeschnittene Blätter in feuchter Atmosphäre wandeln ihre Stärke nur langsam um;

c. dieselben Blätter in trockner Luft verlieren ihre Stärke bald;

Es ist dann auch die Erklärung in der Verschiebung des Stärke-Zucker-Gleichgewichts in der Abbaurichtung beim Entrocknen begründet.

Dass die Ränder zuerst die Stärke verlieren, die Partien in der Nähe des Mittelnerves zuletzt, (wie MÜLLER auch angibt) ist genau so in dieser Weise (ungleiche Austrocknungsgeschwindigkeit dieser Blatteile) einfach zu erklären.

LITTERATUUR.

(LITERATURVERZEICHNIS).

1. AHRNS, W. Weitere Untersuchungen über die Abhängigkeit des gegenseitigen Mengenverhältnisses der Kohlenhydrate im Laubblatt vom Wassergehalt. Bot. Arch. Bd. 5, Heft 3—4, 1924.
2. BANG, I. Zur Methodik der Zuckerbestimmung, Biochem. Zeitschrift, Bd. 49, 1913.
3. BEHRENS, J. Weitere Beiträge zur Kenntnis der Tabakpflanze, I—XII. Landwirtsch. Versuchs-Stationen, Bd. 41—52, 1892—'99.
4. BENECKE, W. und JOST, L. Pflanzenphysiologie, 2 dln., 4. Aufl., 1923—'24. (Fischer Verlag, Jena).
5. BEYERINCK, M. W. Ueber ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter, Verh. Kon. Akad. d. Wetensch. Amsterdam, 2de Sectie, dl. 6, nr. 5, 1898.
6. BIERBERG, W. Die Bedeutung der Protoplasmarotation für den Stofftransport in den Pflanzen. Flora, Bd. 99, 1909.
7. BIJLERT, A. VAN. Onderzoek van Deli-Tabak, Meded. 's Lands Plantentuin, dl. 30, 1899.
8. BLACKMAN and MATTHEAI. A quantitative study of carbon-dioxide assimilation and leaf-temperature in natural illumination. Proc. Royal Soc. London, Vol. 76, 1906.
9. BOEHM, J. Über Stärkebildung aus Zucker, Bot. Zeit. 41, Jahrgang, 1883.
10. BROWN and MORRIS. A contribution to the chemistry and physiology of foliage leaves. Journal of the Chem. Soc., Vol. 63, 1893.
11. BÜSGEN, M. Beobachtungen über das Verhalten des Gerbstoffes in den Pflanzen, Jena, 1889 (Fischer Verlag).
12. CAMPBELL, A. V. Carbohydrates of the Mangold leaf. The Journal of Agric. Sc., Vol. 4, part 3, 1912.
13. COLEMAN. Spike Disease of Sandal. Dep. of Agriculture, Mysore State, 1917.
14. COSTERUS, J. C. Sachs's Iodine experiment (Jodprobe) tried in the tropics. Ann. du Jardin botanique de Buitenzorg, Vol. 12, 1895.
15. CZAPEK, F. Der Kohlenhydratstoffwechsel der Laubblätter im Winter, Ber. d. d. Bot. Ges., Bd. 19, 1901.
16. ——— Biochemie der Pflanzen, 3 dln., 2 und 3. Aufl., 1920—'22 (Fischer Verlag, Jena).

17. DAVIS, W. A. The hydrolysis of Maltose by hydrochloric acid under Herzfeld conditions of inversion, a reply to A. J. KLUYVER. Journ. of Agric. Sc., Vol. 6, part 4, 1914.
18. DAVIS, W. A. and DAISH, A. J. A study of the methods of estimation of carbohydrates, especially in plant-extracts. Journ. of Agric. Sc., Vol. 5, part 4, 1913.
19. DAVIS, W. A. The estimation of starch in plant material. Ebenda Vol. 6, part 2, 1914.
20. ——— The supposed precipitation of reducing sugars by basic lead acetate, Ebenda Vol. 8, part 1, 1916.
21. DAVIS, W. A., DAISH, A. J., SAWYER, G. C. Studies of the formation and translocation of carbohydrates in plants. I—III, Ebenda Vol. 7, part. 3, 1916.
22. DELEANO, N. T. Studien über der Atmungsstoffwechsel abgeschnittener Laubblätter, Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 51, 1912.
23. DIXON, H. H. Transport of organic substances in Plants, Nature, Bd. 110, 1922.
24. ESMARCH. Zur Kenntnis des Stoffwechsels in blattrollkranken Kartoffeln. Ztsch. f. Pflanzenkrankheiten, Bd. 29, 1919.
25. FESCA, M. und IMAI, H. Ueber Kultur, Behandlung und Zusammensetzung japanischer Tabake, Landw. Jahrb. Bd. 17, 1888.
26. GARNER, W. W. Tobacco curing. U. S. Dep. of Agric., Farmers' Bulletin 523.
27. GAST, W. Quantitative Untersuchungen über den Kohlenhydratstoffwechsel im Laubblatt, Hoppe—Seylers Z. schrift. f. Physiol. Chemie, Bd. 99, 1917.
28. GILTAY, E. Ueber die vegetabilische Stoffbildung in den Tropen und in Mitteleuropa. Ann. du Jardin botanique de Buitenzorg, Vol. 15, 1898.
29. GIRARD, A. Recherches sur la saccharogénie dans la betterave. Compt. rendus, dl. 99, 1884.
30. HEINE, H. Ueber die physiologische Funktion der Stärkescheide, Ber. d. d. Bot. Ges., Bd. 3, 1885.
31. HENRICI, Frl. M. Zweigipflige Assimilationskurven. Verh. Naturforsch. Ges., Basel, 1921.
32. HILTNER, L. Weitere Beobachtungen über die „Stärkeschoppung“ in blattrollkranken Kartoffelstauden. Prakt. Blätter für Pflanzenbau und Pflanzenschutz, 17. Jahrg., 1919.
33. HORN, Frl. T. Das gegenseitige Mengenverhältnis der Kohlenhydrate im Laubblatt in seiner Abhängigkeit vom Wassergehalt. Bot. Archiv, 3. Bd., Heft 3, 1923.
34. HUNGER, F. W. T. Physiologische Onderzoekingen over Deli-Tabak. 1. Colorimetrische Zetmeelbepalingen. Meded. uit 's Lands Plantentuin, dl. 66, 1903.
35. ——— De Mozaiek-ziekte bij Deli-Tabak. Ebenda dl. 63, 1903.
36. ——— Untersuchungen und Betrachtungen über die Mosaik-Krankheit der Tabakspflanze, Ztschr. f. Pflanzenkrankh., 15. Jahrg., Heft 5, 1905.
37. ILJIN, W. S. Die Wirkung hochkonzentrierter Lösungen auf die Stärkebildung in den Spaltöffnungen der Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 61, 1922.

38. ILJIN W.S. Über den Einfluss des Welkens der Pflanzen auf die Regulierung der Spaltöffnungen, II. Einfluss des Welkens auf den Stärkegehalt der Schliesszellen, Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 61, 1922.
39. KISZLING, R. Handbuch der Tabakkunde, des Tabakbaues und der Tabakfabrikation. 4. Aufl., 1920. (Paul Parey Verlag, Berlin).
40. KLUYVER, A. J. Biochemische Suikerbepalingen. Diss., Delft, 1913.
41. LEHMANN, M. und TOBATA, S. Chemische Analyse zweier japanischer Tabaksorten, Landwirtsch. Versuchs-Stationen, Bd. 60, 1904.
42. LIDFORSS, B. Zur Physiologie und Biologie der wintergrünen Flora. Botan. Centralbl. Bd. 68, 1896.
43. LOEW, O. Curing and fermentation of Cigar Leaf Tobacco. U. S. Dep. of Agric., Rep. 59.
44. ———— Physiological Studies of Connecticut Leaf Tobacco, Ebenda, Rep. 65.
45. LUNDEGÅRDH, H. „Der Temperaturfaktor bei Kohlensäureassimilation und Atmung“. Biochem. Zschrift. Bd. 154, 1924.
46. ———— Einige Bedingungen der Bildung und Auflösung der Stärke. Jahrb. f. wiss. Botanik, Bd. 53, 1914.
47. MATTHAEI, Miss G. C. On the effect of temperature on carbondioxide assimilation. Phil. Transact., Vol. 197, 1904.
48. MAYER, ADOLF. Über die klimatischen Bedingungen der Erzeugung von Nikotin in der Tabakspflanze. Landwirtsch. Versuchs-Stationen, Bd. 38, 1891.
49. MEYER, ARTHUR. Bildung der Stärkekörner in den Laubblättern aus Zuckerarten, Mannit und Glycerin. Bot. Zeit. 44. Jahrgang, 1886.
50. ———— Ueber die Assimilationsprodukte der Laubblättern angiospermer Pflanzen. Bot. Zeitung, Bd. 43, 1885.
51. ———— Die Hülle der Chromatophoren. Ber. d. d. Botan. Ges. Bd. 41, 1923.
52. MIEHE, H. „Über die Lebensdauer der Diastase.“ Ber. d. d. Botan. Ges. Bd. 41, 1923.
53. MOHR, E.C. JULIUS. Over het oogsten van Deli-Tabak op verschillende tijden van den dag. Meded. uit 's Lands Plantentuin, dl. 56, 1902.
54. MOLISCH, H. Über den Einfluss der Transpiration auf das Verschwinden von Stärke in den Blättern. Ber. d. d. Bot. Ges., Bd. 39, 1921.
55. ———— Über die Herstellung von Photographien in einem Laubblatte. Sitzber. d. Kais. Akad. d. Wiss. i. Wien, Bd. 123, Abt. I, 1914.
56. MÜLLER—THURGAU, H. Ueber das Verhalten von Stärke und Zucker in reifenden und trocknenden Tabaksblättern. Landwirtsch. Jahrb., Bd. 14, 1885.
57. ———— Ueber Zuckeranhäufung in Pflanzentheilen in Folge niederer Temperatur. Landwirtsch. Jahrb., Bd. 11, 1882.
58. ———— Ueber die Natur des in süßen Kartoffeln sich vorfindenden Zuckers. Landwirtsch. Jahrb., Bd. 14, 1885.
59. MURPHEY, P. A. On the cause of rolling in Potato foliage; and some further insect carriers of the leaf-roll disease. Dep. of Agric. for Ireland, no. 20, 1923.
60. NEGER, F. W. Die Stärkeökonomie der grünen Pflanze. Naturwiss. Zschr. f. Forst u. Landwirtschaft, Bd. 13, 1915.
51. ———— Die Blattrollkrankheit der Kartoffel. Zschr. f. Pflanzenkrankh., Bd. 29, 1919.

62. OORTWIJN BOTJES, J. G. De bladrolziekte van de Aardappelplant. Diss. Wageningen, 1920.
63. PARKIN, J. The carbohydrates of the foliage leaf of the snowdrop and their bearing on the first sugar of photosynthesis. The Biochemical Journ. Vol. 6.
64. PFEFFER, W. Pflanzenphysiologie, zweite Aufl. (Wilhelm Engelmann Verlag, Lzg.), 1904.
65. PRINSEN—GEERLIGS, H. L. Snelle verandering in samenstelling van eenige tropische vruchten bij het narijpen. Versl. Kon. Akad. v. Wetensch., dl. 17, (1ste gedeelte), 1907.
66. QUANJER, H. M. Sur la fonction du tissu criblé. Meded. v. d. Landb. hoogeschool. Bd. 16, 1919.
67. QUANJER, H. M., DORST, J. C., DIJT, M. D., HAAR, A. W. v. d. De Mozaiekziekte van de Solanaceeën, hare verwantschap met de phloeemnecrose en hare beteekenis voor de Aardappelcultuur. Meded. v. d. Landbouwhoogeschool. Bd. 17, 1919.
68. REINHARD und SUSCHKOFF. Beiträge zur Stärkebildung in der Pflanze. Beih. Bot. Zentralbl. Bd. 18, 1. Abt., 1905.
69. RUHLAND, W. Untersuchungen über den Kohlenstoffwechsel von Beta vulgaris. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 50, 1912.
70. RYWOSCH, S. Zur Stoffwanderung im Chlorophyllgewebe. Bot. Zeit. Bd. 66. 1908.
71. ——— Über Stoffwanderung und Diffusionsströme in Pflanzenorganen. Zschr. f. Bot. Bd. 1, 1909.
72. ——— Über eine Diffusionsbeschleunigung bei Dextrose. Ber. d. d. Bot. Ges. Bd. 29, 1911.
73. SAPOSCHNIKOFF, W. Die Stärkebildung aus Zucker in Laubblättern. Ebenda Bd. 7, 1889.
74. ——— Bildung und Wanderung der Kohlenhydrate in den Laubblättern. Eb. Bd. 8, 1890.
75. ——— Über die Grenzen der Anhäufung der Kohlenhydrate in den Blättern der Weinrebe. Ebenda Bd. 9, 1891.
76. SACHS, J. Ein Beitrag zur Kenntnis der Ernährungsthätigkeit der Blätter. Arb. des Bot. Instit. in Würzburg. dl. 3, 1888.
77. SCHIMPER, A. F. W. Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörner. Bot. Zeit. 41. Jahrgang, 1883.
78. ——— Über Bildung und Wanderung der Kohlenhydrate in den Laubblättern. Bot. Zeit. 43. Jahrgang, 1885.
79. SCHMIDT, J. Een Plukproef. Mededeelingen van Het Deli-Proefstation 4e Jrg., 1909.
80. SCHOORL, N. Het reduceerend vermogen van suikers. Chemisch Weekblad, deel 9, 1912.
81. SCHROEDER, H. Die Hypothesen über die chemischen Vorgänge bei der Kohlensäure-Assimilation. (Fischer Verlag, Jena), 1917.
82. SCHROEDER, H. und HORN, FRL. T. Das Gegenseitige Mengenverhältnis der Kohlenhydrate im Laubblatt in seiner Abhängigkeit vom Wassergehalt. Biochem. Zschr. Bd. 130, 1922.
83. SMITH, E. F. Additional Evidence of the communicability of Peach Yellows and Peach Rosette. U. S. Dep. of Agric. Bur. of Veg. Pathology, Bull. no. 1, 1891.
84. SUZUKI, U. Chemische und Physiologische Studien über die Schrumpf-

- krankheit des Maulbeerbaums, Zschr. f. Pflanzenkrankh., 1902.
85. THODAY, D. Experimental Researches on vegetable assimilation and respiration V. Proc. of the Royal Soc. of London. Series B., Vol. 82, 1910.
 86. TONI, J. B. DE und PAOLETTI, J. Beitrag zur Kenntniss des anatomischen Baues von *Nicotiana Tabacum* L. Ber. d. d. Bot. Ges. Bd. 9, 1891.
 87. TREBOUX, O. Stärkebildung aus Adonit im Blatte von *Adonis vernalis*. Eb. Bd. 27, 1909.
 88. URSPRUNG, A. Über die Stärkebildung im Spektrum. Ebenda, Bd. 35, 1917.
 89. USSLEPP, K. Vorkommen und Bedeutung der Stärkescheide in den oberirdischen Pflanzenteilen, Beihefte z. Bot. Centralbl. Bd. 26, afd. 1, 1910.
 90. VEDRÖDI, V. Eine Studie über die Verbrennlichkeit des Tabaks. Landwirtsch. Versuchsstationen, Bd. 65, 1895.
 91. VRIENS, J. G. C. Het oogsten der Tabak op verschillende tijden van den dag, Meded. van het Deli-Proefstation. 2de Jaarg. 1907—'08.
 92. VRIENS en TIJMSTRA. Diverse publicaties over drogen en fermenteren van Tabak. Meded. v.h. Deli-Proefstation. 1 Jaarg. 1906—'07, e.v.
 93. VRIES, HUGO DE. Ueber die Bedeutung der Circulation und Rotation des Protoplasma für den Stofftransport in der Pflanze", Botan. Zeitung. Bd. 43, 1885.
 94. WATERMAN, H. I. Omzettingen van het zetmeel in Aardappelen tijdens het drogen. Chemisch Weekblad, 11de Jaargang, 1914.
 95. ——— Omzettingen in Aardappelen tijdens het drogen, II. Chem. Weekblad, 12e Jaargang, 1915.
 96. ——— Omzettingen in Aardappelen tijdens het drogen III. Chem. Weekblad, 12e Jaargang 1915.
 97. WEEVERS, TH. Ringwondproeven met bonte takken. Kon Akad. van Wetenschappen te Amsterdam; Versl. v. Wis- en Natuurk. Afd., dl. 32, 1923.
 98. ——— De primair bij de assimilatie optredende koolhydraten. Fysiologische studie met bonte planten. Kon Akad. van Wetenschappen te Amsterdam. Versl. d. Wis- en Natuurk. Afd., Dl 32, 1923.
 99. WENT, F. A. F. C. Chemisch-physiologische Untersuchungen über das Zuckerrohr. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 31, 1898.
 100. WILLSTÄTTER, R. und STOLL, A. Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. (Springer Verlag, Berlin), 1918.
 101. WINKLER, H. Untersuchungen über die Stärkebildung in den verschiedenartigen Chromatophoren, Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 32, 1898.
 102. WOODS, A. F. Observations on the mosaic disease of Tobacco. U. S. Dep. of Agric. Bull. no. 18. Bur. of Plant Industry, 1902.
 103. ZALESKI, W. Zur Kenntniss der Eiweissbildung in den Pflanzen, Ber. d. d. Bot. Ges. Bd. 15, 1897.
 104. ——— Die Bedingungen der Eiweissbildung in den Pflanzen. Bot. Centralblatt Bd. 87, 1901.

Alleen de in deze publicatie aangehaalde litteratuur is opgenomen. Verdere litteratuur over koolhydraatomzettingen bij BENECKE—JOST Bd. 1 (4) en CZAPEK Bd. 1 (16), over de Tabak bij KISZLING (39) en in de Mededeelingen van het Deliproefstation.